

# **Anwendung der isothermalen Mikrokalorimetrie zur physikochemischen Charakterisierung molekularer Interaktionen in pharmazeutischen Formulierungen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Burkhard Christoph Schicke  
aus Helmstedt

1. Referent: Professor Dr. Christel Müller-Goymann

2. Referent: Professor Dr. Monika Mazik

eingereicht am: 01.03.2010

mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.11.2010

Druckjahr 2010

## *Vorveröffentlichungen der Dissertation*

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikation**

M.A. Schubert, B.C. Schicke, C.C. Müller-Goymann: Thermal analysis of the crystallization and melting behaviour of lipid matrices and lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *Int. J. Pharm.* 298, 2005, S. 242-254.

### **Tagungsbeiträge**

B. Schicke, M.A. Schubert, C.C. Müller-Goymann: Thermal analysis of the recrystallisation behaviour of lipid nanodispersions (LND). *Proceedings International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, Nuremberg, 15-18 March, P 631-632 (2004).

B. Schicke, M.A. Schubert, L. Baydoun and C.C. Müller-Goymann: Isothermal Microcalorimetry in Pharmaceutical Applications. *1st International Meeting on Applied Physics Badajoz*, 13-18 October, (2003).

*Für meine Eltern*

Alle Bildung geht schrittweise. Jeder Sprung, wenn er ein wirkliches Vorwärtskommen sein soll, muß zurückgemacht und das Vorwärts schrittweise noch einmal durchgemacht werden.

*Franz Grillparzer*

### *Danksagung*

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung bei dessen Bearbeitung sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und die nette, persönliche Betreuung.

Frau Prof. Dr. Monika Mazik danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die besonders freundliche Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und Hilfestellungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Ursula Jahn für die Durchführung der Röntgenmessungen, die Unterstützung bei den TAM-Messungen und die schöne Zeit im gemeinsamen Labor und bei den Praktikumsbetreuungen. Frau Juliane Schildt danke ich für die Einweisung an der DSC.

Bei Herrn Dr. Martin A. Schubert bedanke ich mich für die sehr hilfreiche Unterstützung und freundschaftliche Zusammenarbeit. Für die ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen Ratschläge (nicht nur bei Computerproblemen) möchte ich mich bei Frau Dr. Meike Harms bedanken.

Herrn Timo Paepenmüller, Frau Dr. Luma Baydoun, Herrn Carlos van Hemelrijck und Frau Dr. Riem Hussein danke ich für die Zusammenarbeit bei den untersuchten Systemen. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Johannes Wengst für die Durchsicht des Manuskripts.

Mein allerherzlichster Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Frau, für die unermüdliche Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Abschließend sei allen Firmen gedankt, die mir Substanzen zur Verfügung gestellt haben. Warenrechtlich geschützte Namen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet



<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>2</b>
2.1	<b>Thermodynamik und Kalorimetrie</b>	<b>2</b>
2.1.1	Thermodynamische Grundlagen	2
2.1.1.1	Thermodynamische Systeme	2
2.1.1.2	Innere Energie	3
2.1.1.3	Wärme und Arbeit	3
2.1.1.4	Wärmekapazität	4
2.1.1.5	Erster Hauptsatz der Thermodynamik: Energieerhaltung	5
2.1.1.6	Enthalpie	6
2.1.1.7	Entropie und der 2. Hauptsatz der Thermodynamik	6
2.1.1.8	Freie Enthalpie	7
2.1.2	Kalorimetrie	8
2.1.2.1	Methoden der Wärmeaufnahme	9
2.1.2.1.1	<i>Kompensation des thermischen Effektes</i>	9
2.1.2.1.2	<i>Messen einer Temperaturdifferenz</i>	10
2.1.2.2	Wärmetransport	11
2.1.2.2.1	<i>Wärmeleitung</i>	12
2.1.2.2.2	<i>Wärmestrahlung</i>	13
2.1.2.2.3	<i>Konvektion</i>	14
2.1.2.3	Systematik und Betriebsarten von Kalorimetern	14
2.1.2.4	Isothermale Wärmeleitungs-Mikrokalorimetrie (IMC)	18
2.2	<b>Übersicht der untersuchten Systeme und Prozesse</b>	<b>18</b>
2.2.1	Stabilität von Arzneimitteln	18
2.2.2	Inkompatibilitäten	20
2.2.3	Untersuchungsbedingungen der Instabilitäten	21
2.2.4	Einsatz der IMC bei Stabilitätsuntersuchungen	21
2.2.5	Diclofenac	22
2.2.6	Nanosuspensionen mit Lipidnanopartikeln	23
2.2.6.1	Vorteile von Lipidnanopartikeln gegenüber anderen kolloidalen Wirkstoffträgern	23
2.2.6.2	Anwendungsmöglichkeiten von SLN	24
2.2.6.3	Herstellungsmethoden von SLN und Lokalisation der Wirkstoffe	25
2.2.6.4	Kristallinität der SLN	26
2.2.7	Kristallisationsmechanismen und Kristallisationskinetik	27
2.2.8	Beladung kolloidaler Arzneistoffträger mit Wirkstoffen	28
2.2.8.1	Beladung von SLN durch Adsorption	29



2.2.8.2	Adsorption von Proteinen	30
2.2.9	Mizellen	31
2.2.10	Inversmizellare Lösungen (IML)	33
2.2.11	Quillaja A und ISCOMs	34
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>36</b>
3.1.1	Natrium-Diclofenac	36
3.1.2	Amphiphile Stärke	36
3.1.3	Wasser	36
3.1.4	Thiomersal und konserviertes Wasser	36
3.1.5	Softisan 154	37
3.1.6	Phospholipon 90G	37
3.1.7	Phospholipon 90H	38
3.1.8	Solutol HS 15	38
3.1.9	Bovines Serum Albumin (BSA)	39
3.1.10	Natrium-Dodecylsulfat	39
3.1.11	Polysorbat 20	39
3.1.12	2-Propanol	39
3.1.13	Isopropylmyristat	40
3.1.14	Quil A	40
<b>3.2</b>	<b>Geräte und Methoden</b>	<b>40</b>
3.2.1	Isothermales Mikrokalorimeter	40
3.2.1.1	Aufbau und Messprinzip des TAM	40
3.2.1.1.1	<i>Wasserbäder und Temperatureinstellung</i>	41
3.2.1.1.2	<i>Messzylinder und Messkanäle</i>	42
3.2.1.1.3	<i>Prinzip der Wärmeaufnahme</i>	44
3.2.1.1.4	<i>Basislinienstabilität</i>	45
3.2.1.1.5	<i>Kalibrierung</i>	45
3.2.1.2	Probenvorbereitung und Messbedingungen	46
3.2.1.2.1	<i>Statische IMC-Messungen</i>	46
3.2.1.2.2	<i>IMC-Titrationsmessungen</i>	48
3.2.2	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	50
3.2.3	Thermogravimetrie (TG)	51
3.2.4	Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)	51
3.2.5	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	52
3.2.6	HPLC	52

3.2.7	Tensiometer	53
3.2.8	Infrarotspektroskopie	53
3.2.9	Herstellung der Lipidnanopartikel	53
3.2.9.1.1	<i>Herstellung der Lipidmatrix (LM)</i>	53
3.2.9.1.2	<i>Herstellung der Nanodispersion</i>	53
3.2.10	Herstellung der Liposomendispersion	54
3.2.11	Herstellung der BSA-Lösungen	54
3.2.12	Herstellung der inversmizellaren Lösung	54
3.2.13	Prüfung auf signifikante Unterschiede von Mittelwerten (t-Test)	54
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Stabilitäts- und Kompatibilitätsuntersuchungen von Natrium-Diclofenac (DfNa)</b>	<b>55</b>
4.1.1	Lagerstabilität von Natrium-Diclofenac bei geringer Feuchte	56
4.1.2	IMC Lagerstabilität von Natrium-Diclofenac bei 100% rH	56
4.1.3	HPLC, IR, TG Ergebnisse der DfNa Lagerproben	58
4.1.4	DSC Untersuchungen von DfNa	58
4.1.5	Röntgenweitwinkeldiffraktometrie der DfNa-Proben	60
4.1.6	Regeneration des DfNa-Hydrates durch Trocknung	61
4.1.7	Resultat der Stabilitätsuntersuchungen von DfNa	63
4.1.8	IMC-Kompatibilitätsuntersuchung von DfNa mit HICAP100	64
<b>4.2</b>	<b>Untersuchungen an Lipidmatrices und Lipidnanopartikeln (SLN)</b>	<b>67</b>
4.2.1	Kristallisationsverhalten von Lipidmatrices	67
4.2.1.1	IMC-Untersuchungen	67
4.2.1.2	WAXD-Messungen [Schu]	70
4.2.1.3	DSC der Lipidmatrix	73
4.2.2	Kristallisationsverhalten von SLN mit variierendem P90G-Gehalt	75
4.2.2.1	IMC-Messungen der SLN	76
4.2.2.2	WAXD der SLN mit unterschiedlichem P90G-Gehalt [Schu]	77
4.2.2.3	DSC der SLN mit unterschiedlichem P90G-Gehalt	78
4.2.2.4	Kristallisationsmechanismen und Kristallisationskinetik	81
4.2.3	Untersuchung der Nanosuspensionen mit variierender Emulgatorkonzentration	82
4.2.3.1	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	83
4.2.3.2	IMC der SLN mit variierender Emulgatorkonzentration	84
4.2.3.3	DSC der SLN mit variierender Emulgatorkonzentration	85
4.2.3.4	WAXD der SLN mit variierender Emulgatorkonzentration	86

4.2.4	Rekristallisationsuntersuchungen von Lipidmatrices und SLN, hergestellt aus gesättigten Sojalecithinen	87
4.2.4.1	IMC-Untersuchungen der Lipidmatrix	87
4.2.4.1	IMC-Untersuchungen der SLN	88
<b>4.3</b>	<b>Beladung kolloidaler Arzneistoffträger mit Proteinen</b>	<b>89</b>
4.3.1	Adsorption von BSA an SLN	90
4.3.1.1	IMC-Messungen der Proteinadsorption	90
4.3.1.2	PCS-Messungen der SLN	94
4.3.1.3	Mögliche Ursachen für die Schwankungen der IMC-Signale	96
4.3.2	Adsorptionsuntersuchungen an Liposomen	97
4.3.2.1	IMC der Liposomenbeladung	97
4.3.2.2	PCS-Messungen der Liposomen	99
4.3.2.3	Eignung der IMC zur Detektion von Proteinadsorptionsvorgängen	102
<b>4.4</b>	<b>Mizellbildungsuntersuchungen mittels IMC</b>	<b>102</b>
4.4.1	Bestimmung der CMC von Natriumdodecylsulfat	103
4.4.2	Mizellarisierungsuntersuchungen an Quillaja-Saponin (QA)	105
4.4.3	Charakterisierung inversmizellarer Lösungen mit der IMC	108
4.4.3.1	Inversmizellare Lösung aus P90G und IPM	108
4.4.3.2	Einfluss von Isopropylalkohol auf IML	110
<b>5</b>	<b>Abschlussdiskussion</b>	<b>113</b>
<b>5.1</b>	<b>Stabilitäts- und Kompatibilitätsuntersuchungen von Natrium-Diclofenac (DfNa) und amphiphiler Stärke (HICAP100)</b>	<b>113</b>
5.1.1	Stabilitätsuntersuchung von DfNa und Bildung eines Tetrahydrates	113
5.1.2	Kompatibilitätsuntersuchung von DfNa mit amphiphiler Stärke (HICAP100)	114
<b>5.2</b>	<b>Charakterisierung des Kristallisationsverhaltens von Lecithin-Hartfettgemischen</b>	<b>114</b>
5.2.1	Kristallisationsverhalten P90G-haltiger Lipidmatrices	114
5.2.2	Kristallisationsverhalten P90G-haltiger SLN	115
5.2.3	Kristallisationsverhalten P90H-haltiger Lipidmatrices und SLN	116
<b>5.3</b>	<b>Adsorption des Modelproteins BSA an kolloidale Wirkstoffträger</b>	<b>117</b>
<b>5.4</b>	<b>Mizellarisierungsverhalten unterschiedlicher Assoziationskolloide</b>	<b>118</b>
<b>5.5</b>	<b>Abschließende Beurteilung der IMC</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>

# 1 Einleitung und Problemstellung

Erste kalorimetrische Untersuchungen wurden bereits 1760 von Black und 1781 durch Wilcke durchgeführt (1). Praktische Bedeutung hat die Thermoanalyse allerdings erst in den vergangenen 50 Jahren erlangt. Durch die technische Entwicklung hat sich die Qualität und Genauigkeit von Kalorimetern so weit entwickelt, dass Thermoanalytische Verfahren heute zum Standard in Entwicklung und Qualitätskontrolle im naturwissenschaftlichen und technischen Bereich gehören. Neben den etablierten Methoden, wie der Dynamischen Differenz-Kalorimetrie oder der Differenzthermoanalyse, wurden in den letzten zwei Jahrzehnten auch viele neue Methoden entwickelt, so dass der Bereich der Thermischen Analyse und der Kalorimetrie sehr vielfältig geworden ist.

Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Methode der Isothermalen Mikrokalorimetrie (IMC) ist ein sehr empfindliches Messverfahren zur Erfassung von Wärmeströmen bis hinab zu 0,1  $\mu$ W. Es handelt sich um ein schonendes, nichtinvasives und nichtdestruktives Verfahren.

Nahezu jeder physikalische oder chemische Prozess ist von einem Wärmeaustausch begleitet. Die Erfassbarkeit extrem kleiner Wärmemengen ermöglicht ein sehr vielseitiges Einsatzgebiet dieser Methode. Die Vielseitigkeit impliziert andererseits eine geringe Selektivität dieses Verfahrens. Aus diesem Grund ist es wichtig, zumindest zur Etablierung dieser Methode für einen neuen Anwendungsbereich, zusätzliche Messverfahren zur Interpretation des Wärmeflusses heranzuziehen. In der vorliegenden Arbeit soll die Eignung der IMC für unterschiedliche, pharmazeutisch-technologische Anwendungen untersucht werden.

Hierzu werden Stabilitäts- und Kompatibilitätsuntersuchungen am Beispiel von Diclofenac-Natrium in Kombination mit amphiphiler Stärke durchgeführt. Die Stabilitäten verschiedener dispergierter Arzneiformen mit Nanopartikeln beziehungsweise Liposomen werden ebenfalls geprüft. Weiterhin werden molekulare Wechselwirkungen im Zusammenhang mit dem Rekristallisationsverhalten von Hartfetten, der Aggregation von Monomeren zu Mizellen und der Adsorption von Proteinen an kolloidale Arzneistoffträger untersucht.

Ziel ist es auch, die Methode mit anderen etablierten Verfahren zu vergleichen und Vor- und Nachteile der isothermalen Mikrokalorimetrie aufzuzeigen.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Thermodynamik und Kalorimetrie

#### 2.1.1 Thermodynamische Grundlagen

Die Thermodynamik beschreibt verschiedene Formen der Energie, sowie deren Umwandlung im Verlauf von Prozessen. Im Folgenden sollen aus diesem Gebiet nur einige Grundbegriffe erläutert werden, die zur Interpretation kalorimetrischer Messungen notwendig sind.

##### 2.1.1.1 Thermodynamische Systeme

Jedes System ist durch eine Grenze von seiner Umgebung abgetrennt. Je nach Permeabilität der Grenze werden verschiedene Arten von Systemen unterschieden. Ein offenes System liegt vor, wenn zwischen System und Umgebung Wärme und Stoffe ausgetauscht werden können. Ist nur ein Energie-, jedoch kein Massenaustausch möglich, handelt es sich um ein geschlossenes System. Bei abgeschlossenen Systemen kann weder ein Energie- noch ein Massenaustausch stattfinden (Abbildung 2.1).

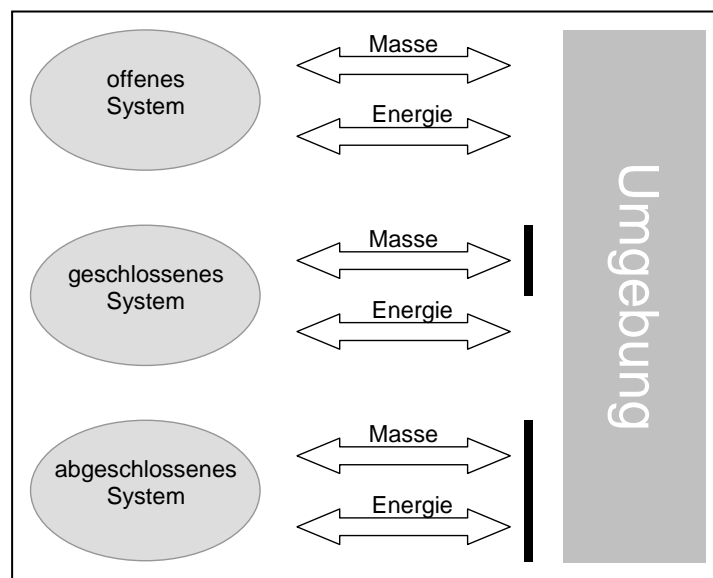


Abbildung 2.1: Thermodynamische Systeme

### 2.1.1.2 Innere Energie

Die Innere Energie ( $U$ ) ist eine extensive Zustandsgröße, die von vielen Variablen des betrachteten Systems abhängig ist. Eine Zustandsgröße beschreibt einen momentanen Zustand, über welchen Weg dieser Zustand erreicht wurde, ist unerheblich. Durch die Vielzahl der Einflussgrößen, wie beispielsweise physikalischer Zustand, Druck und Temperatur, ist ein absoluter Betrag nicht bestimmbar. Vielmehr wird ein Teilbetrag der  $U$  im Verlauf von Prozessen zur Charakterisierung unterschiedlicher Zustände herangezogen. Dazu betrachtet man die Differenz der  $U$  zwischen Anfangs- und Endzustand eines Prozesses. Grob kann man den in einer Materie gebundenen Energiegehalt in folgende drei Komponenten unterteilen:

Der chemische Teil der  $U$  ist in Form von Bindungsenergie in den molekularen Verbindungen enthalten. Sie ist ein Maß für die Stärke bzw. Stabilität einer chemischen Verbindung. Beim Ausbilden einer Verbindung wird dieselbe Bindungsenergie freigesetzt, die zu ihrer Auflösung aufgewendet werden muss.

Ein großer Anteil der  $U$  entfällt auf die Kernenergie, die in den einzelnen Atomkernen gespeichert ist und die bei Kernreaktionen, wie Kernspaltung oder –fusion, freigesetzt wird.

Der physikalisch-thermische Teil, als thermische Energie bezeichnet, beruht auf der kinetischen Energie sowie Rotations- und Schwingungsenergie der Moleküle unter Berücksichtigung inter- und intramolekularer Wechselwirkungen. Für den jeweiligen Stoff ergibt sich die thermische Energie ( $E_{th}$ ) aus der Masse ( $m$ ), der spezifischen Wärmekapazität ( $c$ ) und der Temperatur ( $T$ ):

$$E_{th} = m \cdot c \cdot T$$

*Gleichung 2.1*

Die thermische Energie einer Substanz, die sich proportional zu ihrer Temperatur verhält, kann man sich anschaulich als unkontrollierte Bewegungsenergie der Atome beziehungsweise Moleküle vorstellen.

### 2.1.1.3 Wärme und Arbeit

Im Gegensatz zur Energie sind Wärme und Arbeit Prozessgrößen. Das Auftreten einer dieser Größen führt zwangsläufig zu einer Umverteilung an Energie. Wärme

und Arbeit sind nicht direkt messbar, sondern nur über ihre Wirkung, die sie im Verlauf eines Prozesses hervorrufen. Dies spiegelt sich auch in der Definition für die frühere Messeinheit der Wärme, die Kalorie, wieder: Eine Kalorie ( $\text{cal}_{15^\circ}$ ) ist die Wärmemenge, die 1 g Wasser bei einem Umgebungsdruck von 1 bar von  $14,5^\circ\text{C}$  auf  $15,5^\circ\text{C}$  erwärmt (2). Heute wird Wärme als Energiemenge in Joule (J) angegeben.

Voraussetzung für das Auftreten von Wärme – oder anschaulicher eines Wärmeflusses – ist das Vorhandensein eines Temperaturgradienten. Wie später erläutert, kann Wärme immer nur von einem Körper höherer Temperatur auf einen geringerer Temperatur übertragen werden.

Wärme und Arbeit lassen sich voneinander erst nach ihrer Energieübertragung und nach ihrer Wirkung voneinander unterscheiden. In Abbildung 2.2a ist die Übertragung in Form von Arbeit dargestellt. Aus der gleichgerichteten Energieübertragung resultiert eine Kraft, die entlang eines Weges wirkt. Bei Wärme handelt es sich, wie in Abbildung 2.2b gezeigt, nicht um eine gerichtete Energieübertragung. Sie führt zu unkoordinierten Teilchenbewegungen (3).

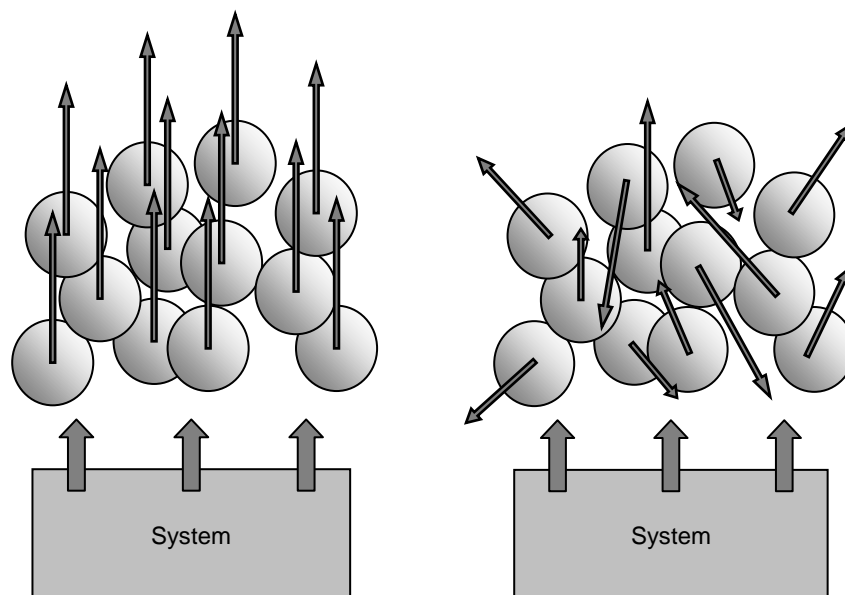


Abbildung 2.2a: Arbeit – gerichtete Energieübertragung      2.2b: Wärme – ungerichtete Energieübertragung

#### 2.1.1.4 Wärmekapazität

Durch die Wärmekapazität ( $C$ ) wird ausgedrückt, wieviel Wärme ( $Q$ ) notwendig ist, um die Temperatur eines Körpers zu verändern. Anschaulich beschreibt sie das Speichervermögen eines Körpers für thermische Energie.

$$C = \frac{\Delta Q}{\Delta T}$$

*Gleichung 2.2*

Die Wärmekapazität eines Stoffes hängt von den äußeren Bedingungen, wie Druck und Volumen, ab. Sie ändert sich ebenfalls, zumindest in gewissen Temperaturbereichen, mit der Temperatur eines Stoffes. Die spezifische Wärmekapazität ist eine stoffbezogene, physikalische Größe, bei der die Wärmekapazität auf eine bestimmte Masse bezogen wird. Entsprechendes gilt für die molare Wärmekapazität, bei der die Bezugsgröße die Stoffmenge ist.

#### **2.1.1.5 Erster Hauptsatz der Thermodynamik: Energieerhaltung**

Der erste Hauptsatz der Thermodynamik besagt, dass Energie, innerhalb gewisser Grenzen, von einer Form in die andere überführt werden kann, sie dabei aber erhalten bleibt. Wärme und Arbeit sind gleichwertige Möglichkeiten, die Innere Energie eines Systems zu beeinflussen. Ob während eines Prozesses die Innere Energie zum Großteil als Wärme oder Arbeit auf ein anderes System oder die Umgebung übertragen wird, hängt von der Art des Prozesses ab. Nimmt die Innere Energie zu, so ist  $\Delta U$  positiv, nimmt sie ab, ist  $\Delta U$  negativ. Die Änderung  $\Delta U$  setzt sich aus der beim Prozess ausgetauschten Wärme  $Q$  und der geleisteten Arbeit  $W$  zusammen.

$$\Delta U = U_{II} - U_I = Q + W$$

*Gleichung 2.3*

Kann vom betrachteten System keine Arbeit geleistet werden, beispielsweise bei einer Reaktion in einem Kalorimeter mit konstantem Volumen (Bombenkalorimeter), so entspricht die gemessene Wärme direkt der Änderung der inneren Energie  $\Delta U$  des Systems.

$$Q = \Delta U$$

*Gleichung 2.4*



### 2.1.1.6 Enthalpie

Relativ selten werden Reaktionen bei konstantem Volumen betrachtet. Meist wird mit offenen Systemen bei konstantem Druck  $p$  (Atmosphärendruck) gearbeitet. In diesem Fall entspräche die ausgetauschte Wärme nicht mehr der Änderung  $\Delta U$ , weil Volumenänderungsarbeit verrichtet werden würde. Zur leichteren Charakterisierung dieser Vorgänge führt man den Begriff der Enthalpie ein. Die Enthalpieänderung  $\Delta H$  im Verlauf eines Prozesses ist die Summe aus der veränderten inneren Energie  $\Delta U$  und der Volumenänderungsarbeit  $p\Delta V$ . Sie entspricht der bei konstantem Druck unter Volumenänderung ausgetauschten Wärmemenge ( $Q$ ).

$$Q = \Delta H = \Delta U + p \cdot \Delta V$$

*Gleichung 2.5*

Diese ist experimentell relativ leicht zugänglich. Die bei einer Reaktion umgesetzte Enthalpie wird als Reaktionsenthalpie bezeichnet. Eine Unterscheidung zwischen  $\Delta U$  und  $\Delta H$  ist allerdings nur bei solchen Prozessen von Bedeutung, die von einer deutlichen Volumenänderung begleitet sind, beispielsweise bei einer Gasentwicklung. Beschränkt sich die Reaktion auf die Umsetzung einer Flüssigkeit oder eines Feststoffs ohne gravierende Volumenveränderung bei konstantem Druck, gilt nahezu  $\Delta U = \Delta H$ .

Anhand der Enthalpie unterscheidet man zwischen:

- Exothermen Reaktionen ( $\Delta H < 0$ ), bei denen Wärme vom System an die Umgebung abgegeben wird, und
- Endothermen Reaktionen ( $\Delta H > 0$ ), bei denen Wärme vom System aus der Umgebung aufgenommen wird.

### 2.1.1.7 Entropie und der 2. Hauptsatz der Thermodynamik

Die Veränderung der Enthalpie im Verlauf eines Prozesses ist nicht ausschlaggebend dafür, ob eine Reaktion freiwillig abläuft oder nicht. Die Entscheidung für die Durchführbarkeit eines Vorgangs liegt in der Umverteilung der Energie. Ein Maß für die gleichmäßige Verteilung der Energie, und somit auch ein Maß für die Freiheitsgrade eines Systems, ist die Entropie  $S$ . Sie ist eine extensive Zustands-

größe. Die Entropie eines zusammengesetzten Systems ist demnach gleich der Summe der Entropien seiner Teilsysteme (4). Der 2. Hauptsatz der Thermodynamik besagt, dass eine Reaktion dann freiwillig ablaufen kann, wenn die gesamte Entropie  $S_{\text{Gesamt}}$  zunimmt ( $\Delta S \geq 0$ ) oder, anders ausgedrückt, dass die thermische Energie möglichst gleichmäßig über alle Komponenten von System und Umgebung verteilt wird. Die Änderung der Gesamt-Entropie setzt sich aus der Änderung der System-Entropie und der Umgebungs-Entropie zusammen:

$$\Delta S_{\text{Gesamt}} = \Delta S_{\text{System}} + \Delta S_{\text{Umgebung}}$$

*Gleichung 2.6*

An die Übertragung von Wärme ist eine Änderung der Entropie gebunden. Würde Energie bei einem reversiblen Prozess ausschließlich in Form von Arbeit ausgetauscht werden, bliebe die Entropie konstant. Allgemein steigt bei konstantem Druck die Entropie eines Systems mit zunehmender Temperatur. Allerdings ist die Veränderung der Entropie eines Systems durch eine bestimmte übertragene Wärmemenge im Verlauf eines Prozesses von der absoluten Temperatur abhängig.

$$\Delta S = \frac{\Delta Q}{T}$$

*Gleichung 2.7*

Im Verlauf eines Prozesses ergeben sich theoretisch drei Möglichkeiten für  $\Delta S_{\text{Gesamt}}$ . Daraus sind folgende Aussagen für die Durchführbarkeit abzuleiten:

- $\Delta S_{\text{Gesamt}} = 0$  für reversible Vorgänge und
- $\Delta S_{\text{Gesamt}} > 0$  für irreversible Vorgänge
- $\Delta S_{\text{Gesamt}} < 0$  ein solcher Vorgang kann nicht stattfinden

#### **2.1.1.8 Freie Enthalpie**

Die freie Enthalpie ( $G$ ) stellt eine Verknüpfung zwischen der Enthalpie ( $H$ ) und der Entropie ( $S$ ) in Abhängigkeit von der absoluten Temperatur ( $T$ ) dar (Gleichung 2.8).

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

*Gleichung 2.8*

Anhand der Veränderung der freien Enthalpie im Verlauf eines Prozesses ist eine Aussage über den Ablauf einer Reaktion möglich:

- Prozesse mit einer positiven Freien Enthalpiedifferenz ( $\Delta G > 0$ ) laufen nicht ab (Endergonische Reaktion).
- Prozesse, bei denen die Freie Enthalpie unverändert bleibt ( $\Delta G = 0$ ), befinden sich im thermodynamischen Gleichgewicht.
- Prozesse mit negativer Differenz der Freien Enthalpie ( $\Delta G < 0$ ) laufen spontan ab. Das Produkt ist in einem thermodynamisch stabileren Zustand (Exergonische Reaktion).

Betrachtet man die Reaktionsenthalpie und die -entropie eines Systems, gibt es drei Möglichkeiten, die zu einer negativen Freien Enthalpie führen können:

- $\Delta H < 0 \wedge \Delta S > 0$  Die Reaktion ist exotherm, und die Entropie des Systems nimmt zu. Unabhängig von der Temperatur wird die Reaktion immer freiwillig ablaufen.
- $\Delta H < 0 \wedge \Delta S < 0$  Die Reaktion ist exotherm, und die Entropie nimmt ab. In Abhängigkeit der Temperatur kommt es zum Ablauf der Reaktion. Je tiefer die Temperatur, desto eher läuft sie ab. Durch die Wärmeentwicklung bremst sich die Reaktion selbst.
- $\Delta H > 0 \wedge \Delta S > 0$  Die Reaktion ist endotherm und läuft nur aufgrund einer Entropiezunahme des Systems ab. Hohe Temperaturen begünstigen den Ablauf der Reaktion.

### 2.1.2 Kalorimetrie

Die Kalorimetrie ist ein thermoanalytisches Verfahren zur Erfassung von Wärme  $Q$ , beziehungsweise Wärmeflüssen  $dQ/dt$ . Wie bereits beschrieben, ist Wärme eine Form der Energieübertragung, die nicht unmittelbar, sondern nur durch ihre Wirkung erfasst werden kann. Das Prinzip eines Kalorimeters ist es, die von einem System abgegebene Wärme möglichst quantitativ zu erfassen und in ein messbares Signal zu überführen.

Zu einem Wärmefluss zwischen zwei Systemen kann es nur dann kommen, wenn zwischen diesen Systemen eine Temperaturdifferenz  $\Delta T$  besteht und die Möglichkeit

des Wärmestroms durch einen thermischen Kontakt sichergestellt ist. Dabei kann die Wärme (ohne Aufwendung von Energie) nur von einem Gegenstand höherer Temperatur zu einem Gegenstand niedriger Temperatur übertragen werden (0. Hauptsatz der Thermodynamik).

### **2.1.2.1 Methoden der Wärmeerfassung**

#### *2.1.2.1.1 Kompensation des thermischen Effektes*

Der Wärmeaustausch eines Systems mit der Umgebung muss nicht unbedingt zu einer Temperaturänderung der Umgebung führen. Die übertragene Wärme kann beispielsweise durch eine Phasenumwandlung ausgeglichen werden. Dieses Prinzip findet z.B. bei dem Eis-Kalorimeter von Lavoisier und Laplace (um 1780) Verwendung. Ein Eis-Wassergemisch nimmt die von einem Objekt abgegebene Wärme auf. Dadurch kommt es zum Schmelzen einer bestimmten Eismenge, jedoch nicht zu einer Temperaturänderung der Eis-Wasser-Suspension, solange noch Eis vorhanden ist. Die geschmolzene Eismasse  $\Delta m$  ist der abgegebenen Wärme  $\Delta Q$  proportional:

$$\Delta Q = c_u \cdot \Delta m$$

*Gleichung 2.10*

Bei bekannter spezifischer Umwandlungswärme  $c_u$  kann so die vom Objekt abgegebene Wärme quantifiziert werden; vorausgesetzt, dass die Phasenumwandlung des Eises ausschließlich durch die Wärmeabgabe des Objektes bedingt ist.

Eine andere Möglichkeit zur Quantifizierung von Wärme ohne eine Temperaturänderung der Umgebung ist die Kompensation durch eine chemische Umsetzung bekannter Reaktionswärme. Durch den Verbrauch an Reagenz kann die vom Objekt ausgetauschte Wärme bestimmt werden. Diese Methode hat allerdings kaum praktische Bedeutung.

Das Verfahren, das bei einem isothermen Versuchsaufbau heute Anwendung findet, ist die Kompensation durch thermoelektrische Effekte. Die Wärme bzw. Energie, die von einem Objekt mit der Umgebung ausgetauscht wird, ergibt sich aus der elektrischen Leistung über den betrachteten Zeitraum. Die elektrische Leistung ist das Produkt aus Spannung ( $U$ ) und Stromstärke ( $I$ ).

$$\Delta Q = \int u(t) \cdot I(t) dt$$

Gleichung 2.11

Endotherme Effekte können über Heizwiderstände, exotherme Effekte über Kühlung mit Peltier-Elementen kompensiert werden. Der Vorteil dieser Kalorimeter liegt in der genauen Quantifizierbarkeit der elektrischen Messgrößen.

#### 2.1.2.1.2 Messen einer Temperaturdifferenz

Die Erfassung von Wärme kann über das Messen einer Temperaturdifferenz erfolgen. Man unterscheidet dabei zwischen einer zeitlichen und einer räumlichen Temperaturdifferenz. Bei einer zeitlichen Temperaturdifferenz  $\Delta T(t)$  wird beispielsweise die Temperatur einer bekannten Wassermenge vor und nach dem Einbringen einer Probe bestimmt.

$$\Delta T = T(t_0) - T(t_1)$$

Gleichung 2.12

Aus der Temperaturdifferenz kann bei bekannter spezifischer Wärmekapazität  $c$  des Wassers in diesem Temperaturbereich die ausgetauschte Wärme  $\Delta Q$  bestimmt werden:

$$\Delta Q = \Delta T \cdot c$$

Gleichung 2.13

Dabei ist die Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität von Stoffen zu berücksichtigen. Der Versuchsaufbau sollte deshalb so gewählt sein, dass es zu keiner starken Temperaturänderung kommt.

Die Bestimmung von Wärme über eine örtliche Temperaturdifferenz ist ein Prinzip, das beispielsweise in modernen Wärmeleitungskalorimetern zur Anwendung kommt. In einem geschlossenen Probengefäß, das vor dem Einbringen der Probe überall die Temperatur  $T_0$  hat, sei ausschließlich durch eine wärmeleitende Verbindung der thermische Kontakt zwischen Probe und einem Thermostaten hergestellt (Abbildung 2.3).



Abbildung 2.3: Messprinzip der örtlichen Temperaturdifferenz in einem Wärmeleitungs-Kalorimeter

Man misst nach Einsetzen der Probe die Temperaturen ( $T_0$ ,  $T_1$ ) an zwei Stellen ( $x_0$ ,  $x_1$ ) des Wärmeleiters. Bei bekannter Wärmeleitfähigkeit des Verbindungsmaterials  $\lambda$  und der Querschnittsfläche  $a$  ergibt sich der Wärmeleitkoeffizient  $L$  zu:

$$L = \frac{\lambda \cdot a}{\Delta x}$$

Gleichung 2.14

Der über den Wärmeleiter transportierte Wärmestrom ( $\Phi$ ) ergibt sich demnach zu Gleichung 2.15a. Durch Integration nach der Zeit erhält man die von der Probe abgegebene Wärmemenge (Gleichung 2.15b):

$$\Phi = \Delta T \cdot L$$

Gleichung 2.15a

$$Q = \int \Delta T(t) \cdot L \, dt$$

Gleichung 2.15b

Diese Betrachtung gilt allerdings nur für den Idealfall, dass die Wärme ausschließlich über die wärmeleitende Verbindung abgeführt wird. In der Praxis treten begleitend Wärmeverluste durch Wärmelecks auf. Dies sind Wege des Wärmeaustausches, die messtechnisch nicht erfasst werden. Man kann sie aber durch eine Kalibrierung der Messapparatur berücksichtigen.

### 2.1.2.2 Wärmetransport

Wärmetransport ist immer ein irreversibler Vorgang mit dem Ziel des Temperaturbeziehungsweise Wärmeausgleichs. Es gibt verschiedene Arten des Wärmetransportes (Abbildung 2.4). Obwohl man sie systematisch unterscheidet, wird nie

nur eine reine Form der Wärmeübertragung stattfinden, sondern die verschiedenen Effekte werden immer parallel ablaufen. Allerdings ist es möglich, durch den apparativen Aufbau bestimmte Formen der Wärmeübertragung zu begünstigen. Die Kenntnis möglicher Wärmetransportwege in einem Kalorimeter ist für die Qualitätsbeurteilung und die Versuchsplanung Voraussetzung.

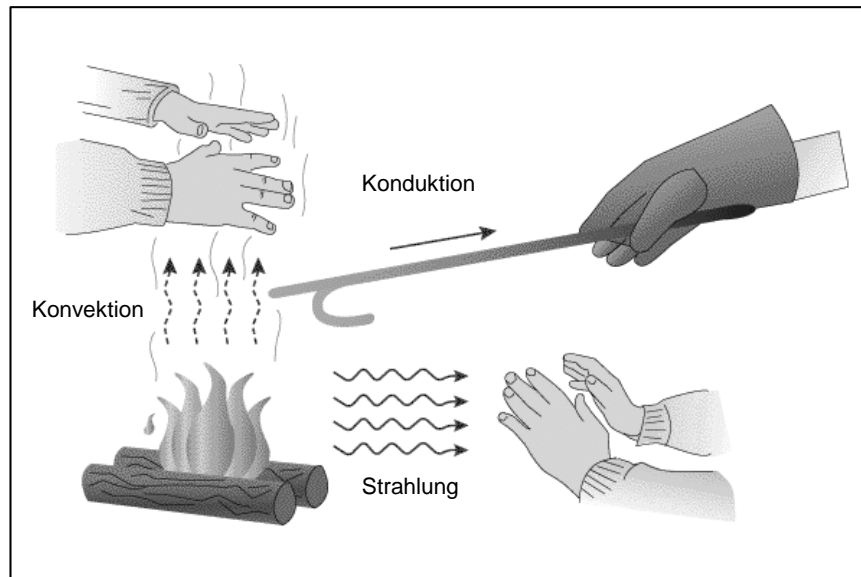


Abbildung 2.4: Wege des Wärmetransportes (5)

### 2.1.2.2.1 Wärmeleitung

Unter Wärmeleitung / Konduktion versteht man den Wärmeaustausch zwischen benachbarten Atomen oder Molekülen auf Grund von Molekülschwingungen ohne einen daran gekoppelten Massentransport. Da diese Form des Wärmeaustausches zum Großteil nur in Feststoffen auftritt, wird diese Art des Austausches auch als Festkörperleitung bezeichnet.

Betrachtet man den Wärmestrom durch einen Wärmeleiter, beispielsweise einen Metalldraht, in Abhängigkeit von der Zeit durch Messen der Temperaturen ( $T_0$ ,  $T_1$ ) an zwei unterschiedlichen Abschnitten ( $x_0$ ,  $x_1$ ) des Leiters (vergl. Abbildung 2.3), so zeigt sich, dass der Wärmestromverlauf eines plötzlichen, kurzzeitigen Ereignisses am Ende der Wärmeleitstrecke recht „verschmiert“ ankommt (Abbildung 2.5). Schlechte Wärmeleitfähigkeit des Materials und lange Wärmeleitwege würden die Empfindlichkeit eines Kalorimeters herabsetzen, weil kurzandauernde Wärmeflussspitzen durch die Verzögerung und Verzerrung des Wärmestroms nicht mehr erfasst werden würden.

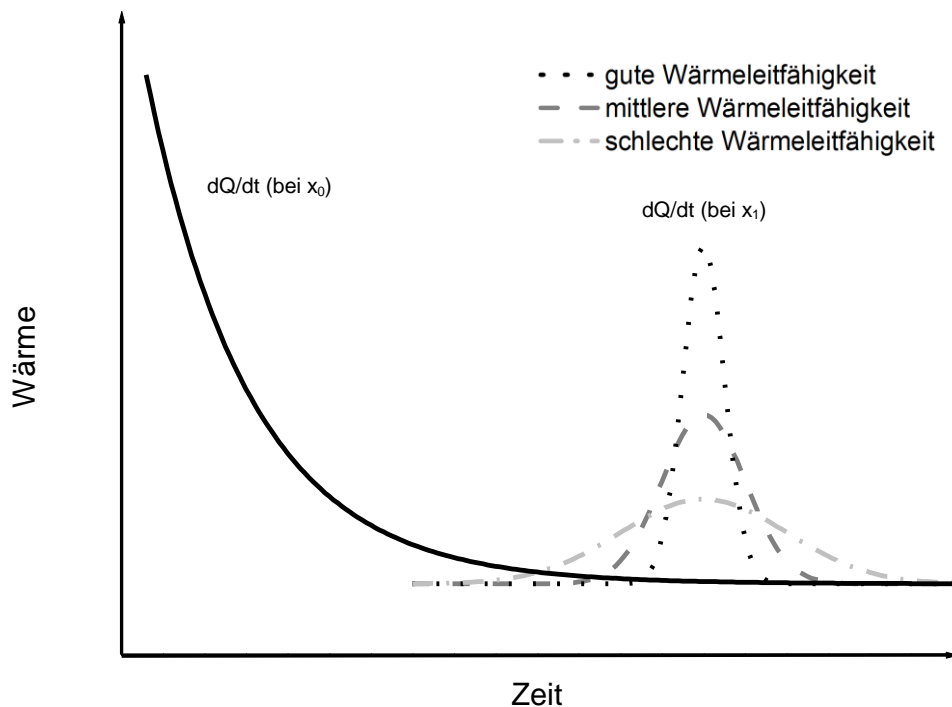


Abbildung 2.5: Einfluss der Wärmeleitfähigkeit auf die Signalqualität und Empfindlichkeit des Kalorimeters. Eine schlechte Wärmeübertragung im Kalorimeter führt zu schwachen, langandauernden Signalen.

Dies ist ein allgemeines Problem moderner Kalorimeter, deren Wärmetransport vorwiegend über Konduktion erfolgt. Um schnell ablaufende Prozesse realistisch zu erfassen, ist eine Korrektur der zeitlichen Verzögerung und der Verschmierung notwendig. Diese mathematische Korrektur erfolgt mit Parametern, die durch eine Kalibrierung des Systems gewonnen werden (6).

#### 2.1.2.2 Wärmestrahlung

Wärmestrahlung ist eine elektromagnetische Strahlung, die ein Körper in Abhängigkeit seiner Temperatur emittiert. Das Emittieren elektromagnetischer Wellen stellt grundsätzlich eine Energieabgabe, die Absorption eine Energieaufnahme dar. Die Energie elektromagnetischer Wellen kann reversibel in Wärme transformiert werden. Mit Erhöhung der Temperatur steigt die Intensität der Strahlung. Desweiteren verhält sich die Wellenlänge des Emissionsmaximums umgekehrt proportional zur Temperatur. Wärmestrahlung ist nicht unbedingt auf das Infrarotspektrum beschränkt. Körper sehr hoher Temperaturen erzeugen elektromagnetische Wellen



im sichtbaren und ultravioletten Wellenlängenbereich. Bei Raumtemperatur ist der Anteil der Wärmeübertragung durch Strahlung relativ gering.

#### *2.1.2.2.3 Konvektion*

Bei einem Wärmeaustausch durch Konvektion findet ein Transport von Volumenelementen eines Mediums durch eine Strömung statt. Je nach Ursache des Massentransportes unterscheidet man zwischen freier und erzwungener Konvektion. Bei der freien Konvektion wird die Strömung durch Temperaturdifferenzen und damit verbundene Dichteunterschiede im Medium selbst erzeugt. Das Ausmaß der freien Konvektion ist nur ungenau zu kalkulieren, weil Intensität und Richtung der Strömung von vielen Parametern abhängen und es oft zu Turbulenzen im Medium kommt, die nicht reproduzierbar sind. Man versucht deshalb, freie Konvektion bei kalorimetrischen Untersuchungen weitgehend auszuschließen. Wenn überhaupt, so tritt sie als Störfaktor in Form von Wärmelecks auf.

Von erzwungener Konvektion spricht man, wenn die Strömung des Mediums durch ein angelegtes Druckgefälle, z.B. Pumpen oder Rühren, erzeugt wird. Erzwungene Konvektion dient beispielsweise in Wasser-Thermostaten dem Erhalt einer konstanten, einheitlichen Temperatur.

Konvektion kann im engeren Sinn nicht als Wärmeübertragung angesehen werden. Die Innere Energie verlässt zu keinem Zeitpunkt die Materie. Vielmehr wird die Innere Energie durch den Stofftransport nur mitgeführt. Diese Art des Transportes findet in Substanzen statt, deren elementare Bestandteile sich leicht zueinander verschieben können.

#### **2.1.2.3 Systematik und Betriebsarten von Kalorimetern**

Eine Einteilung der verschiedenen Kalorimeter kann zum einen, wie oben beschrieben, durch das Prinzip der Wärmeerfassung erfolgen – Messen von Wärme über eine Temperaturdifferenz oder durch Kompensation mittels eines thermischen Prozesses entgegengesetzten Vorzeichens. Man unterscheidet bei Kalorimetern den Scanning Betrieb, bei dem die Temperatur der Probe während einer Messung verändert wird, und den statischen Betrieb bei konstanter Probertemperatur. Ein weiteres Kriterium zur Klassifizierung ist die Bauart. Danach unterscheidet man

zwischen Einfach- und Zwillingskalorimetern. Einfachkalorimeter bestehen aus einer Messeinheit. Heute ist es allgemein üblich Zwillingskalorimeter zu betreiben. Sie bestehen aus zwei Messsystemen, eines enthält die Probe, das andere eine Referenzsubstanz. Man führt in der Regel eine differenzielle Messung zwischen Probe und Referenz durch. Dies hat den Vorteil, dass sich externe Störungen, wie beispielsweise Druck- oder Temperaturschwankungen, auf beide Messsysteme auswirken und bei der Differenzbildung weitestgehend eliminiert werden.

Zur Unterscheidung der Betriebsarten eines Kalorimeters ist es sinnvoll, das Kalorimeter in zwei Bereiche zu unterteilen: das Messsystem und die Umgebung, wobei die Begrenzung der Bereiche funktional zu betrachten ist. Einige Bestandteile, wie beispielsweise Rührer, Thermometer, Isolation, gehören teilweise zum Messsystem und teilweise zur Umgebung. Alle Teile, die in irgendeiner Form durch die Probenreaktion eine Änderung erfahren, sind dem Messsystem zuzuordnen. Der thermische Kontakt zwischen Messsystem und Umgebung sollte ausschließlich über einen Wärmewiderstand erfolgen. Das Kalorimeter selbst ist von der Außenwelt umgeben, die unter Umständen mit den Bereichen des Kalorimeters in Wechselwirkung treten und zu Störungen führen kann (Abbildung 2.6).

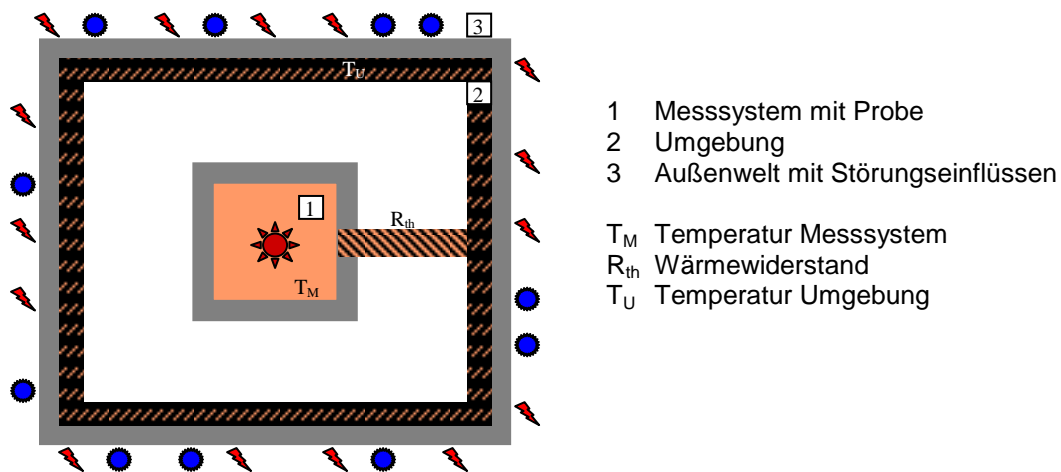


Abbildung 2.6: Allgemeiner Aufbau eines Kalorimeters

Die verschiedenen Betriebsarten von Kalorimetern unterscheiden sich in der Austauschbarkeit der Wärme zwischen dem Messsystem und der Umgebung.

Unter isoperiboler Betriebsart versteht man den Betrieb bei konstanter Umgebungstemperatur und möglicherweise unterschiedlicher Temperatur des Messsystems. Der Wärmefluss zwischen Messsystem und Umgebung hängt bei definiertem Wärme-

widerstand im Allgemeinen linear von der Temperatur des Messsystems ab. Die Wärme ergibt sich aus der Temperaturdifferenz zwischen Messsystem und Umgebung über den Messzeitraum:

$$Q = \frac{1}{R_{th}} \int_{t_a}^{t_e} \Delta T(t) dt$$

*Gleichung 2.16*

Bei adiabatischer Betriebsart findet im Idealfall kein Wärmeaustausch zwischen Messsystem und Umgebung statt. Um dies zu gewährleisten, muss zum einen der Wärmewiderstand sehr groß sein (thermische Isolation), darüber hinaus muss, insbesondere bei längerandauernden Reaktionen, die Temperatur der Umgebung an die des Messsystems angepasst werden. Nur so kann sichergestellt werden, dass der Wärmeaustausch auf ein Minimum reduziert ist. Die Wärmemenge, die während des Versuches aufgenommen oder abgegeben wird, ergibt eine Temperaturänderung  $\Delta T$  des Messsystems, die umgekehrt proportional zu dessen Wärmekapazität ist.  $\varepsilon$  sei die Kalibrierkonstante für das gesamte Kalorimetersystem, dann ergibt sich die Wärme direkt über die Temperaturänderung des Messsystems.

$$Q = \varepsilon \cdot \Delta T$$

*Gleichung 2.17*

Bei isothermer Betriebsart sind die Temperaturen von Messsystem und Umgebung gleich und konstant. Die bei einer Reaktion entstehende oder verbrauchte Wärme wird komplett durch die Umgebung ausgeglichen. Voraussetzung ist ein schnell ansprechender Wärmeleiter zwischen Messsystem und Umgebung mit sehr kleinem Wärmewiderstand und eine Umgebung mit extrem hoher Wärmekapazität. Absolute Isothermie ist praktisch nicht zu realisieren; der kontrollierte Transfer der Wärme zwischen Messsystem und Umgebung erfolgt über in Reihe geschaltete Thermoelemente, die in die Wand der Messzelle eingebaut sind und minimale Temperaturunterschiede zwischen Messsystem und Umgebung erfassen können (vergl. Abbildung 2.7). Durch eine hohe Anzahl an Thermopaaren  $n$  wird zum einen der Wärmewiderstand geringer, zum anderen erhöht sich die Empfindlichkeit, weil sich die Thermospannungen ( $u_{Th}$ ) der einzelnen Thermoelemente addieren. Der

Seebeck-Koeffizient  $e$  ist abhängig vom Material der Thermoelemente und stellt eine thermoelektrische Konstante dar.

$$u_{th} = n \cdot e \cdot \Delta T$$

Gleichung 2.18

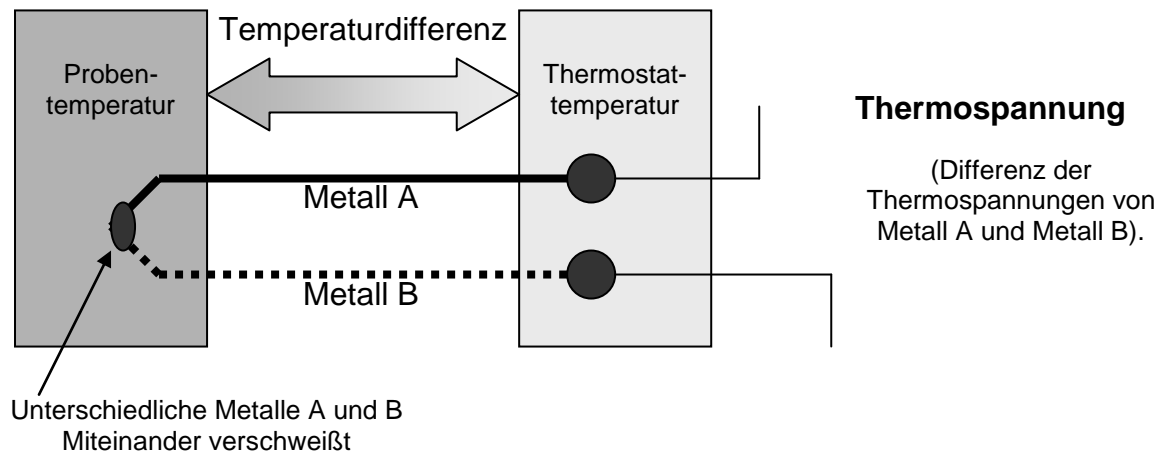


Abbildung 2.7: Prinzip eines Thermoelementes. Die einzelnen Thermospannungen ( $u_{Th}$ ) in Reihe geschalteter Thermoelemente addieren sich und erhöhen somit die Empfindlichkeit eines Kalorimeters

Da in der Praxis die Wärme nicht komplett über die Thermoelemente ausgetauscht wird, sondern immer ein kleiner Anteil über Wärmelecks verloren geht, ist die Ermittlung einer gerätespezifischen Kalibrierkonstante  $\varepsilon$  notwendig, um quantitative Wärmemessungen durchführen zu können:

$$U = \varepsilon \cdot \frac{dQ}{dt}$$

Gleichung 2.19

Die gemessene Spannung  $U$  ist dadurch direkt proportional zum Wärmefluss. Die Fläche unter der aufgezeichneten Spannungs-Zeit-Kurve stellt die ausgetauschte Wärme dar.

$$Q = \frac{1}{\varepsilon} \cdot \int_{t_a}^{t_e} U dt$$

Gleichung 2.20

#### **2.1.2.4 Isothermale Wärmeleitungs-Mikrokalorimetrie (IMC)**

Die Wärmeleitungskalorimetrie stellt das empfindlichste kalorimetrische Messverfahren dar. Der Wärmefluss über Wärmeleitung ist im Vergleich zur Konvektion oder Strahlung am besten zu kontrollieren. Das erste Mikrokalorimeter, das 1948 von Calvet entwickelt wurde, hatte eine Erfassungsgrenze von 10  $\mu\text{W}$ . Mit modernen Geräten lassen sich Wärmeflüsse bis hinab zu 100 nW auflösen. Diese Empfindlichkeit und das Messprinzip ermöglichen die unterschiedlichsten Anwendungen der isothermalen Mikrokalorimetrie. Eigenschaften und Aufbau des verwendeten Mikrokalorimeters werden in Abschnitt 3 Material und Methoden näher erläutert.

## **2.2 Übersicht der untersuchten Systeme und Prozesse**

### **2.2.1 Stabilität von Arzneimitteln**

Die Stabilität eines Arzneimittels (AM) ist eine der Voraussetzungen für seine Anwendbarkeit. Nur wenn die Haltbarkeit eines AM über einen bestimmten Zeitraum sichergestellt ist, kann auch seine Wirksamkeit und Unbedenklichkeit gewährleistet sein. Bis zur Anwendung des AM müssen noch mindestens 90% der deklarierten Wirkstoffmenge vorhanden sein (7). Instabilitäten können im harmlosen Fall ohne Auswirkungen auf die therapeutische Qualität eines AM verlaufen, indem sie beispielsweise nur zu einer Verfärbung des Präparates führen. In den meisten Fällen jedoch gehen die Veränderungen mit einem Wirksamkeitsverlust einher. Noch schwerwiegender ist die Entstehung toxischer Abbauprodukte, so dass eine Anwendung des AM nicht mehr erfolgen darf. Bei der Entwicklung und Kontrolle von AM sind Stabilitätsuntersuchungen nicht nur des Wirkstoffs und der Hilfsstoffe, sondern auch der Arzneiform und des Packmittels von Bedeutung. Insbesondere bei komplexen Wirkstoffträgern, die die Freisetzung des Arzneistoffs steuern, ist die Wirksamkeit von der Funktionsfähigkeit der Matrix abhängig.

Für die Überprüfung der Stabilität von Arzneistoffen beziehungsweise AM ist es in der Regel notwendig, die potentiellen Veränderungen der Komponenten möglichst genau zu kennen, um geeignete Untersuchungsverfahren auszuwählen. Mit zunehmender Anzahl an Inhaltsstoffen steigt zum einen die Wahrscheinlichkeit von Inkompatibilitäten, außerdem wird es aufwendiger, die Stabilität der einzelnen

Komponenten nachzuweisen. Bei sehr komplexen Inhaltsstoffgemischen, wie beispielsweise bei pflanzlichen Drogenextrakten, kann mit konventionellen Analysemethoden die Stabilität aller Inhaltsstoffe kaum auf einmal nachgewiesen werden. Gerade dann ist eine Methode, wie die IMC, die sehr viele Arten von Veränderungen erfassen kann, von Vorteil. Allerdings muss im Falle eines Wärmefflusses beurteilt werden können, ob dieser tatsächlich einer Instabilität zuzuweisen ist.

Ein weiteres Problem der Stabilitätsuntersuchungen liegt in der Detektierbarkeit einiger Vorgänge. Adsorptionseffekte oder sterische Veränderungen von Molekülen, wie sie beispielsweise in Proteinlösungen auftreten können, sind schwierig zu erfassen. Insbesondere bei AM mit sehr geringer Wirkstoffkonzentration werden Untersuchungsmethoden mit hoher Empfindlichkeit benötigt, um so minimale Veränderungen noch feststellen zu können.

Man unterscheidet zwischen chemischen, physikalischen und mikrobiologischen Instabilitäten. Unter chemischer Instabilität versteht man alle chemischen Veränderungen, wie beispielsweise Hydrolyse, Oxidationsreaktionen oder Polymerisation eines Bestandteils. Für das Auftreten chemischer Zersetzungsreaktionen ist die Molekülstruktur bedeutsam. Das Vorhandensein bestimmter funktioneller Gruppen, aber auch die sterischen Verhältnisse, insbesondere bei großen Molekülen, beeinflussen die Prädisposition für Instabilitätsreaktionen (8). Durch äußere Einflüsse, wie Licht, Sauerstoff, pH-Wert oder Temperatur, kann es zur Überwindung der Aktivierungsenergie und damit zum Einsetzen der Zersetzungsreaktion kommen.

Durch physikalische Instabilitäten, wie beispielsweise Partikelwachstum, Änderung der Kristallmodifikation oder Sorption von Wasser, wird die Zustandsform bestimmter Arzneimittelkomponenten verändert. Unterschiedliche polymorphe Formen einer Substanz sind zwar chemisch identisch, weisen aber mehr oder weniger unterschiedliche physikalische Eigenschaften auf. Änderungen in der Löslichkeit können gravierende Auswirkungen auf die Freisetzung und Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs haben. Besonders bei festen oder mehrphasigen Arzneiformen ist die Kontrolle der physikalischen Stabilität wichtig. Die Veränderungen werden oft durch

äußere Einwirkungen, wie Druck, mechanische Beanspruchung, Temperatur und relative Feuchte, forciert.

Unter mikrobiologischen Instabilitäten fasst man das Eindringen und das Vermehren von Mikroorganismen zusammen. Die Problematik liegt zum einen in der direkten Pathogenität oder auch Toxizität der Mikroorganismen, sie können darüber hinaus aber auch zu einer Zersetzung des AM mit entsprechendem Wirksamkeitsverlust führen. Die mikrobiologische Stabilität eines AM ist nicht nur über den reinen Lagerzeitraum, sondern auch über die gesamte Anwendungsphase sicherzustellen. Insbesondere bei Mehrdosenbehältnissen ist die mikrobielle Belastung während der Anwendungsphase besonders hoch. Je nach Art des AM und der Applikationsart sind entsprechende Vorkehrungen von der Auswahl der Rohstoffe über den Herstellungsprozess bis zur Konservierung und Verpackung zum Schutz des AM zu treffen.

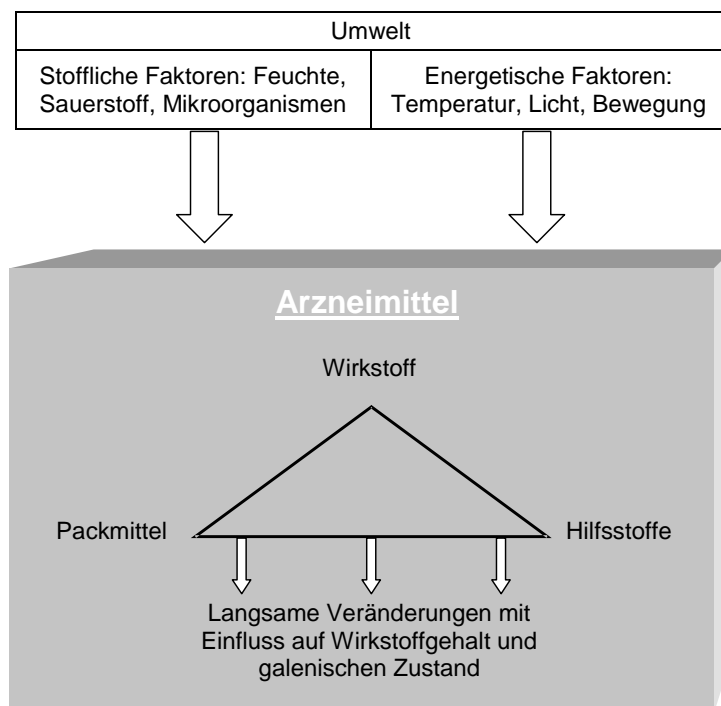


Abbildung 2.8: Instabilitäten und Inkompatibilitäten bei Arzneimitteln (9)

### 2.2.2 Inkompatibilitäten

Bei Stabilitätsuntersuchungen müssen alle Komponenten eines Arzneimittels im Zusammenspiel erfasst werden (Abbildung 2.8). Die einzelnen Stoffe können isoliert betrachtet zwar eine ausreichende Stabilität besitzen, mit anderen Bestandteilen aber unerwünschte Wechselwirkungen eingehen; in diesem Fall spricht man von

Inkompatibilitäten. Es können sowohl chemische als auch physikalische Ursachen dafür verantwortlich sein. Die Folge kann eine Beeinträchtigung des Wirkstoffs, der Arzneiform oder des Packmittels sein. Je nachdem, ob die Wechselwirkungen offenbar sind oder nicht, spricht man von manifesten oder latenten Inkompatibilitäten. Für die Arzneimittelsicherheit stellen die latenten Inkompatibilitäten das größere Problem dar, weil es sich um nicht offensichtlich erkennbare oder sehr langsam ablaufende Prozesse handelt.

### **2.2.3 Untersuchungsbedingungen der Instabilitäten**

Grundsätzlich verlangen die Zulassungsbehörden Langzeitstudien zum Nachweis der Haltbarkeit von Arzneimitteln (10). In der Entwicklungsphase ist es allerdings gängige Praxis, einzelne Komponenten des Arzneimittels Stressbedingungen zu unterziehen, um Umwandlungen und Zersetzungsreaktionen zu beschleunigen (11), (12). Je nach Art der Reaktion und zugehöriger Reaktionsordnung können Geschwindigkeitsparameter ermittelt werden, die Rückschlüsse auf die Stabilität unter normalen Lagerbedingungen zulassen. Allerdings sind diese Schlussfolgerungen nicht immer korrekt. Insbesondere bei physikalischen Veränderungen ist die Kinetik der Umwandlungen relativ komplex (10). Verzögerungsperioden und exponentielle Reaktionsparameter erschweren die Extrapolation der Daten. Hinzu kommt die Tatsache, dass einige metastabile Systeme unter den normalen Lagerbedingungen eine ausreichende Stabilität besitzen, weil ihre Aktivierungsenergie sehr hoch ist. Unter Stressbedingungen, wie erhöhter Temperatur, kann es dann zu Umwandlungen kommen, die in der Praxis nicht zu beobachten wären. Ziel der Untersuchungen muss es deshalb sein, die Stabilität des gesamten Arzneimittels unter realistischen Lagerbedingungen zu überprüfen.

### **2.2.4 Einsatz der IMC bei Stabilitätsuntersuchungen**

Die IMC wird in unterschiedlichen Bereichen für Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt (13), (14). Der Vorteil der Methode liegt in der Vielseitigkeit der Anwendungen. Sowohl chemische Veränderungen (15), (16), (17) als auch physikalische Veränderungen (18), (19), (20) können erfasst werden. Dabei können die Messbedingungen über einen weiten Bereich variiert werden. Durch Zusatzausstattungen besteht die Möglichkeit, Untersuchungen unter Begasung oder bei variabler relativer



Feuchte durchzuführen. Die Empfindlichkeit der Methode ermöglicht in den meisten Fällen eine Untersuchung bei Raumtemperatur (21), (22) und somit bei realistischen Lagerbedingungen. Anhand der aufgezeichneten Wärmeflusskurven können Reaktionskinetiken ermittelt werden (23).

Allerdings ist in der Literatur (21) die Problematik bekannt, dass es, insbesondere bei Mehrkomponentensystemen, zu Überlagerungssignalen aus verschiedenen parallel ablaufenden Prozessen kommen kann und dass dies einer der Hauptgründe für den bisher zurückhaltenden Einsatz der IMC bei Stabilitätsprüfungen ist. Eine Aufspaltung des Signals in separate Reaktionsverläufe wäre nur dann möglich, wenn bereits einzelne Reaktionskinetiken und die dazugehörigen Reaktionswärmen bekannt sind.

Liegt nicht die Ermittlung einzelner Geschwindigkeitsparameter im Vordergrund, so ist die IMC besonders für Mehrkomponentensysteme und auch Kompatibilitätsuntersuchungen gut geeignet (24), (25), weil sie verschiedenste Wechselwirkungen der einzelnen Bestandteile auf einmal erfasst. Jedoch ist nicht jeder Wärmefluss, der durch die Kombination verschiedener Bestandteile entsteht, sofort auf eine Inkompatibilität zurückzuführen. Zur genauen Interpretation der Wärmesignale sind ergänzende Messverfahren notwendig.

### **2.2.5 Diclofenac**

Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Substanz wird therapeutisch das Natriumsalz der [2-(2,6-Dichloranilino)phenyl]essigsäure verwendet. Natrium-Diclofenac (DfNa) wird als nichtsteroidales Antiphlogistikum bei Entzündungen und leichten bis mittleren Schmerzen eingesetzt. Die Wirkung beruht auf einer nichtselektiven Hemmung der Cyclooxygenasen. Es kommt bei rheumatischen Erkrankungen, Gelenkerkrankungen, akuten Verletzungen der Skelettmuskulatur und postoperativen Schmerzen zum Einsatz. Nach oraler Applikation weist DfNa eine gute Bioverfügbarkeit auf. Die Substanz ist in unterschiedlichen Arzneiformen (magensaftresistente Tabletten, Retardtabletten und -kapseln, Suppositorien, Injektionslösungen, Augentropfen und verschiedenen halbfesten Zubereitungen zur dermalen Applikation) als Fertigarzneimittel auf dem Markt.

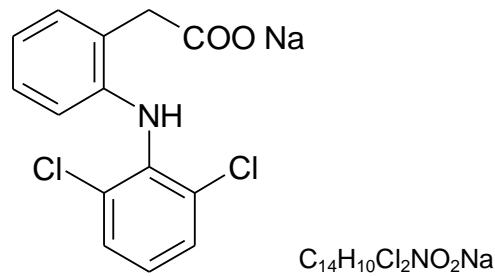


Abbildung 2.9: Strukturformel Natrium Diclofenac

Chemisch ist die Substanz (Mr 318,1) den Arylacetaten zuzuordnen. DfNa ist ein weißes, kristallines, schwach hygroskopisches Pulver mit einem Schmelzpunkt von 289 °C. Die Löslichkeit in Wasser beträgt bei 20 °C 1,5 g/l. Der pH-Wert einer 0,1 %igen Lösung von DfNa liegt zwischen 7 – 7,5.

DfNa kann neben der wasserfreien Form auch als Tetrahydrat vorkommen. Dies entsteht durch Kristallisation des Arzneistoffs aus wässriger Lösung (26). In wässriger Lösung ist DfNa nicht stabil (27). Die Zersetzungsreaktionen sind abhängig vom pH-Wert. Es kann zur intramolekularen Cyclisierung (28) und, bei hohen pH-Werten, zur anschließenden Spaltung der Verbindung (27) sowie zur Oxidation kommen. Bei pH 5 ist die Stabilität der Lösung am größten.

## 2.2.6 Nanosuspensionen mit Lipidnanopartikeln

### 2.2.6.1 Vorteile von Lipidnanopartikeln gegenüber anderen kolloidalen Wirkstoffträgern

Feste Lipidnanopartikel (SLN vom Englischen: solid lipid nanoparticles) wurden vor circa 15 Jahren als Arzneiform entwickelt (29), (30). Im Gegensatz zu Emulsionen und Liposomen handelt es sich bei Nanosuspensionen um eine disperse Arzneiform mit bei Raumtemperatur festen Partikeln, suspendiert in einer wässrigen, kontinuierlichen Phase. Diese haben einen Durchmesser zwischen 50 – 1000 nm. Die feste Lipidmatrix kann mit Tensiden, aber auch mit Polymeren stabilisiert werden. Da SLN meist aus physiologischen Komponenten zusammengesetzt sind, weisen sie im Gegensatz zu Polymernanopartikeln (31) eine sehr gute Verträglichkeit (32) und Bioabbaubarkeit (33) auf. Zur intravenösen Applikation werden Nanosuspensionen aus Triglyceriden bevorzugt, die hauptsächlich gesättigte C16 und C18 Fettsäuren beinhalten, weil diese auch Bestandteile der parenteralen Ernährung sind. Als physiologisch gut verträglicher Emulgator kommt Lecithin zum Einsatz.

Sehr lipophile Wirkstoffe weisen oft Probleme in ihrer Bioverfügbarkeit auf (34). Durch Einarbeitung dieser Stoffe in kolloidale Systeme, wie Liposomen oder Mizellen, kann die Bioverfügbarkeit entscheidend verbessert und das Nebenwirkungsrisiko gesenkt werden. Allerdings ist die physikalische Stabilität dieser kolloidalen Arzneistoffträger, insbesondere nach Einarbeitung des Wirkstoffs, oft gering. SLN bieten hier den Vorteil einer hohen Lagerstabilität. Wässrige Dispersionen sind über 12 bis 36 Monate stabil (35). Durch die Möglichkeit der Lyophilisation lässt sich die Lagerzeit sogar noch verlängern (36).

Es besteht die Möglichkeit, sowohl sehr lipophile als auch hydrophile Arzneistoffe in die Lipidmatrix einzuarbeiten. Durch die sehr große innere Oberfläche der Nano-suspension und die Möglichkeit der intravenösen Applikation kann auch bei sehr hydrophoben Substanzen eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit erreicht werden (37). Bei Mizellen und Emulsionen kommt es in Abhängigkeit vom Verteilungskoeffizienten des Wirkstoffs unter Umständen zu einer sehr schnellen Liberation. Die Inkorporation des Arzneistoffes in die Lipidmatrix ermöglicht eine kontrollierte Freisetzung über mehrere Stunden bis Tage je nach Zusammensetzung der Matrix und Lokalisation des Wirkstoffs. Als Freisetzungsmechanismen kommen Diffusion des Wirkstoffs aus der Matrix oder eine durch Abbau der Trägermatrix bedingte Freisetzung in Betracht.

### **2.2.6.2 Anwendungsmöglichkeiten von SLN**

Die Anwendungsmöglichkeiten der SLN sind vielfältig. Neben der parenteralen Applikation könnte ein Schwerpunkt in der topischen Anwendung sowohl im pharmazeutischen als auch im kosmetischen Bereich liegen. Beim Auftragen der Dispersion auf die Haut bildet sich ein Film aus dicht gepackten SLN (38). Durch Okklusion kommt es zu einem Anstieg der Hautfeuchtigkeit und einer Verbesserung der Penetration (39). Im Gegensatz zu lipophilen Salben resultiert jedoch keine fettig glänzende Hautoberfläche.

Bei ophthalmologischer Applikation lassen sich durch den Einsatz von SLN eine längere Verweildauer und bei inkorporierten Arzneistoffen eine retardierte Freisetzung erzielen (40). Außerdem sind die Sichtbeeinträchtigungen durch wässrige SLN Dispersionen geringer als durch ölige oder halbfeste Zubereitungen.

Für die Anwendung der Formulierung in der Mundhöhle sind die adhäsiven Eigenschaften und die große innere Oberfläche für eine gute Bioverfügbarkeit von Vorteil.

Bei peroraler Applikation biopharmazeutisch problematischer Stoffe kann durch den Einsatz von SLN eine vergrößerte und konstante Bioverfügbarkeit erreicht werden (41). Durch die Einarbeitung säurelabiler Arzneistoffe, wie beispielsweise Peptide in SLN, kann ihre Stabilität im Magen verbessert werden (42).

### **2.2.6.3 Herstellungsmethoden von SLN und Lokalisation der Wirkstoffe**

Mit der Mikroemulsionstechnik (30) und der Solvent Injection Methode (43) können Dispersionen mit nur geringem Lipidgehalt hergestellt werden. Die früher gängigen Herstellungsmethoden mit Ultraschall oder mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax) erzeugten sehr weite Partikelgrößenverteilungen bis in den Mikrometerbereich. Die beiden aktuell gängigen Verfahren sind die Heiß- und die Kalthomogenisation. Bei der Heißhomogenisation wird der Arzneistoff in der geschmolzenen Lipidmatrix gelöst und in eine Tensidlösung gleicher Temperatur gegeben. Daraus wird durch Rühren, beispielsweise mit dem Ultra Turrax, eine O/W-Voremulsion hergestellt, die anschließend der Hochdruckhomogenisation bei einer Temperatur oberhalb des Schmelzpunktes der Matrix unterzogen wird. Bei hydrophilen Wirkstoffen ergibt sich bei diesem Verfahren das Problem, dass während des Herstellungsprozesses eine Umverteilung des Wirkstoffes aus der Matrix in die wässrige Phase stattfindet.

Zur Inkorporation von hydrophilen Wirkstoffen wird daher die Methode der Kalthomogenisation eingesetzt. Nach der oben beschriebenen Einarbeitung des Arzneistoffs in die Lipidmatrix wird die Schmelze abgekühlt und im unterkühlten Zustand, beispielsweise mit der Mörsermühle, gemahlen. Die entstandenen Mikropartikel werden unter Rühren in einer kalten Tensidlösung dispergiert und anschließend bei niedriger Temperatur hochdruckhomogenisiert. Der in der Matrix eingeschlossene Wirkstoff kann somit nicht in direkten Kontakt mit der wässrigen Phase treten.

#### 2.2.6.4 Kristallinität der SLN

Die Eigenschaften der SLN werden entscheidend durch ihre Kristallinität beeinflusst. Das Kristallisationsverhalten der Lipidmatrix der SLN differiert zum Teil stark von dem des Bulks. Triglyceride gesättigter Fettsäuren zeigen ein polymorphes Verhalten, sie kommen in drei Modifikationen vor,  $\alpha$ ,  $\beta'$  und  $\beta$ . Die Übergänge sind monotrop, wobei  $\beta$  die thermodynamisch stabile Modifikation ist. Für einige komplexe Hartfettmischungen wurde in der Literatur das Auftreten einer weiteren Modifikation beschrieben (44), (45). Diese als  $\beta_i$  bezeichnete Modifikation tritt als Übergang zwischen der  $\beta'$  und der  $\beta$  Modifikation auf. Die Übergänge zwischen den einzelnen Modifikationen können bereits bei geringen Abweichungen in der Zusammensetzung der Matrix stark variieren. Beispielsweise verzögert die Anwesenheit kleiner Mengen (bereits unterhalb von 1%) an Mono- und Diglyceriden den Übergang in die  $\beta$  Modifikation (46), (47). Andererseits ist beschrieben, dass Phospholipide die Modifikationsänderungen beschleunigen sollen (44). Der Zusatz von Arzneistoffen kann ebenfalls Einfluss auf die Matrixstruktur haben.

Für eine kontrollierte Freisetzung von Arzneistoffen aus der Lipidmatrix müssen die Arzneistoffe über die gesamte Lagerzeit in der Matrix homogen verteilt bleiben. Im Allgemeinen haben Verunreinigungen und Zusatzstoffe die Eigenschaft, die Kristallstruktur einer Substanz zu stören. Nur in seltenen Fällen passen sich Fremdstoffe so gut in ein Kristallgitter ein, dass daraus eine günstigere energetische Struktur resultiert, die Stabilität demnach erhöht wäre. Für die betrachteten Lipidmatrices bedeutet dies, dass durch die Zumischung von Arzneistoffen zur Matrix das Kristallisationsverhalten mehr oder weniger gestört wird (48). Dies kann zur Folge haben, dass die Kristallisation nur unvollständig abläuft. So können zum Teil amorphe Bereiche als unterkühlte Schmelze bestehen bleiben, oder die Modifikationsänderungen erfolgen nicht vollständig bis zur stabilen  $\beta$  Modifikation. Als Konsequenz kommt es zu einem veränderten Freisetzungsprofil aufgrund einer veränderten Löslichkeit der Matrix oder im schlimmsten Fall zu einem Ausstoßen des Arzneistoffs aus der Matrix. Um dies zu verhindern, ist eine Anpassung der Matrixkomposition und des Herstellungsprozesses (49) für den jeweiligen Arzneistoff notwendig.

### 2.2.7 Kristallisationsmechanismen und Kristallisationskinetik

Kristalle sind Festkörper mit dreidimensional-periodischer Anordnung von Elementarbausteinen in Raumgittern (50). Sie entstehen aus amorphen Phasen, in denen es aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den Bausteinen zur Ausbildung von Mikroclustern kommt. Die Lokalisation, Anzahl und Stabilität der Cluster ist von verschiedenen Faktoren des Systems abhängig. Entweder kommt es wieder zum Zerfall dieser Struktur oder es entstehen durch Anwachsen über eine kritische Größe hinaus stabile Kristallkeime (51). Diese wachsen durch die Einbindung von benachbarten Elementarbausteinen und werden zu aktiven Wachstumskeimen der neuen Phase, wobei die Temperatur dabei einen kontrollierenden Faktor darstellt (52). Die Anlagerung weiterer Elementarbausteine an die Kristallisationskeime erfolgt am Anfang recht langsam, anschließend kommt es zu einer schnellen Wachstumsphase und gegen Ende wieder zu einer Verlangsamung des Wachstums. Für den Mechanismus der Kristallisation sind dementsprechend zwei Schritte von Bedeutung – die Entstehung von Kristallisationskeimen und die Integration amorpher Bausteine in das Kristallgitter. Man kann aufgrund der räumlichen Anlagerung an einen Kristallisationskeim verschiedene Arten des Kristallwachstums unterscheiden. Beispielsweise lagern sich bei einem sphärischen Wachstum die Kristallbausteine in allen Raumrichtungen gleichmäßig um den Kristallisationskeim an. Makroskopisch resultiert daraus ein Kristall mit deutlich dreidimensionaler Struktur.

Die hochgeordnete Struktur eines Kristalls ergibt sich aus den verschiedenen Bindungskräften zwischen den einzelnen Bausteinen des Kristalls. Trotz der hohen Ordnung stellt der kristalline Aufbau ein im Vergleich zum amorphen Zustand thermodynamisch (meta-)stabiles System dar. Durch Umorientierung und nachfolgende Änderungen in der Kristallstruktur kann die Substanz unter Umständen in thermodynamisch stabilere Modifikationen mit geringerem Energiegehalt übergehen.

Die Geschwindigkeit der Kristallisation kann durch die Avrami-Gleichung (Gleichung 2.21) beschrieben werden. Dabei stellt  $x(t)$  den von der Zeit abhängigen kristallisierten Anteil dar. Der Avramiparameter  $k$  ist die Geschwindigkeitskonstante für eine isotherm ablaufende Kristallisation. Der Avramiexponent  $n$  lässt, wie Tabelle 2.1 zu entnehmen, einen Rückschluss auf die räumliche Ausbreitung des Kristallwachstums zu.

$$x(t) = 1 - e^{(-k \cdot t^n)}$$

Gleichung 2.21

Tabelle 2.1 Übersicht der Avramiexponenten bei unterschiedlichen Kristallisationsmechanismen (53).

Kristallkeimbildung →	kontinuierlich	kontinuierlich	gesättigt	gesättigt
Kristallwachstum →	Oberflächen- kontrolliert	Diffusions- kontrolliert	Oberflächen- kontrolliert	Diffusions- kontrolliert
Eindimensional	2	1,5	1	0,5
Zweidimensional	3	2	2	1
Dreidimensional	4	2,5	3	1,5

### 2.2.8 Beladung kolloidaler Arzneistoffträger mit Wirkstoffen

Wann und auf welche Weise Nanopartikel mit einem Arzneistoff zusammengeführt werden, beruht zum einen auf den Eigenschaften der Matrix und des Arzneistoffes, zum anderen aber auch auf dem gewünschten Freisetzungsprofil (54).

Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Methoden der Beladung. Bei der inkorporativen Beladung wird der Arzneistoff in der geschmolzenen Matrix gelöst oder dispergiert. Es hängt von den Eigenschaften des Arzneistoffes, wie Verteilungskoeffizient, Löslichkeit usw. ab, wie gut die Einarbeitung in die Matrix erfolgen kann. Aber auch die Beschaffenheit der Lipidmatrix, z.B. Viskosität und Dichte, hat Einfluss auf die Aufnahmefähigkeit des Arzneistoffes. Bei einem schlechten Zusammenspiel von Wirkstoff und Matrix besteht bei dem Herstellungsverfahren der Heißhomogenisation die Gefahr des Wirkstoffaustritts aus der Matrix. Damit es nicht zur Umverteilung des Arzneistoffs in die wässrige Phase kommt, sollte in solchen Fällen die SLN Herstellung durch Kalthomogenisation erfolgen. Der Zusatz von Emulgatoren beziehungsweise Solubilisatoren kann die Stabilität der Matrix ebenfalls verbessern.

Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, empfindliche Substanzen durch Adsorption an die Partikeloberfläche der fertigen SLN zu binden (55). Dies wird beispielsweise auch für das Drug Targeting ausgenutzt (56). Aufgrund der sehr großen Oberfläche verläuft eine Adsorption oft freiwillig beim Mischen des gelösten Adsorbates mit der SLN Dispersion ab.

### **2.2.8.1 Beladung von SLN durch Adsorption**

Bei der adsorptiven Beladung wird die Substanz der bereits hergestellten Nanopartikeldispersion zugefügt. Aufgrund des sehr großen Oberflächen- / Volumenverhältnisses der Dispersion kommt es in der Regel zur spontanen Anlagerung der Moleküle an die Partikeloberfläche. Es bildet sich, teilweise sehr schnell, in einigen Fällen auch erst nach Stunden, ein bestimmtes Verhältnis aus adsorbiertem und im Dispersionsmedium gelösten Stoff aus (57) (Abbildung 2.10). Der Mechanismus der Anlagerung hängt von den Eigenschaften der Adsorptionspartner ab. Meistens erfolgt die Bindung durch schwache intermolekulare Wechselwirkungen, wie beispielsweise Van-der-Waals- oder Coulombkräfte. Ursache für die Adsorption kann sowohl eine Abnahme der Enthalpie als auch ein Entropiegewinn sein.

Für Arzneistoffe ist, zumindest bei nicht-bioabbaubaren Matrices, Voraussetzung, dass die Adsorption reversibel ist und der Arzneistoff durch Ad- und Desorption in seiner Struktur bzw. Wirksamkeit unbeeinflusst bleibt. Sollen nur Linker, Marker oder Moleküle für ein beabsichtigtes Drug Targeting adsorbiert werden, ist in der Regel eine Desorption unerwünscht (58).

Das Verhältnis aus adsorbierter und gelöster Substanz hängt von den Eigenschaften der Substanz, wie beispielsweise Löslichkeit oder Verteilungskoeffizient, ab, die in der Regel keine Veränderung erlauben. Eine Variation des Verteilungsverhältnisses zwischen adsorbiertem und gelöstem Arzneistoff kann durch Änderung der Zusammensetzung des Dispersionsmediums erreicht werden. Beispielsweise kann durch eine Erhöhung der Tensidkonzentration der Anteil an gelöstem Arzneistoff vergrößert werden. Auch die Zusammensetzung der dispergierten Matrix, insbesondere der Partikeloberfläche, hat entscheidende Auswirkungen auf die Bindungskapazität der Nanopartikel. Bereits bei der Herstellung der Matrix können Substanzen der Mischung zugesetzt werden, die sich bevorzugt in der Grenzfläche anlagern und eine Bindung des Arzneistoffes erleichtern. Die Affinität des Arzneistoffs sollte zur Oberfläche der unbeladenen Nanopartikel größer sein als zur Oberfläche der bereits beladenen, weil es ansonsten sehr schnell zur Ausbildung von Multischichten kommen kann und eine koordinierte, gleichmäßige Beladung eher unwahrscheinlich ist. Eine hohe Affinität ist auch beispielsweise bei zur Kohäsion neigenden Substanzen, wie z.B. Proteinen, wichtig, damit es nicht in Folge einer hohen Lösungskonzentration zum Ausfällen der Substanz kommt.



Für die Wirkung eines Arzneimittels ist die Freisetzung des Wirkstoffs von maßgebender Bedeutung. Der in Lösung befindliche Anteil steht gewöhnlich als Initialdosis schnell zur Verfügung. Der adsorbierte Anteil dient als Depot und wird über einen mehr oder weniger langen Zeitraum freigesetzt (59). Das Freisetzungsprofil hängt von der Bindungsstärke und der Löslichkeit des Adsorbates ab. Üblicherweise werden aber Arzneistoffe, die nur adsorptiv gebunden sind, schneller freigesetzt als in Matrices inkorporierte Stoffe (60). Der Hauptgrund für die Beladung durch Adsorption ist, neben dem bereits erwähnten Freisetzungsverhalten, die Möglichkeit, sehr temperatur- und scherempfindliche Stoffe, wie z.B. Proteine (61), (62) an Nanopartikel zu binden.

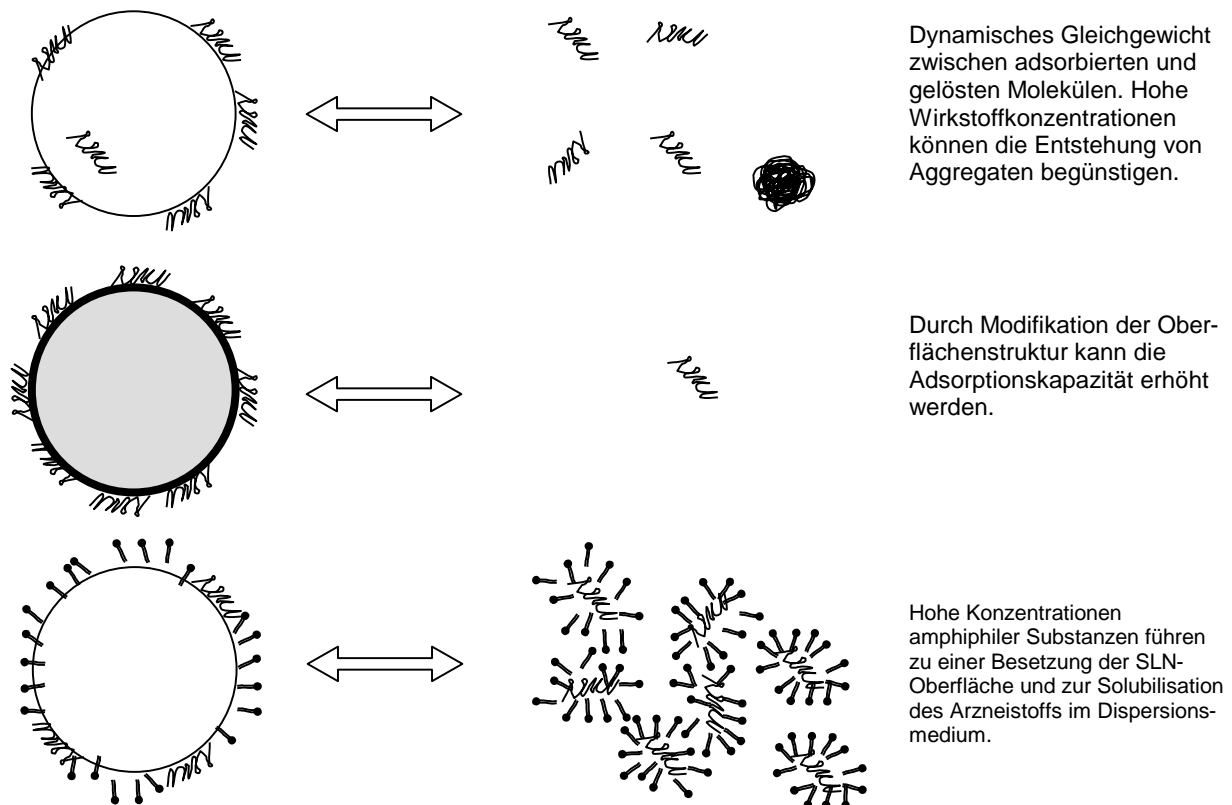


Abbildung 2.10: Variation der Beladungskapazität von Nanopartikeln

### 2.2.8.2 Adsorption von Proteinen

Die Adsorption von Proteinen an feste Oberflächen erfolgt, wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, in der Regel spontan. Viele Faktoren bestimmen das Ausmaß der adsorbierten Proteinmenge (Abbildung 2.11).

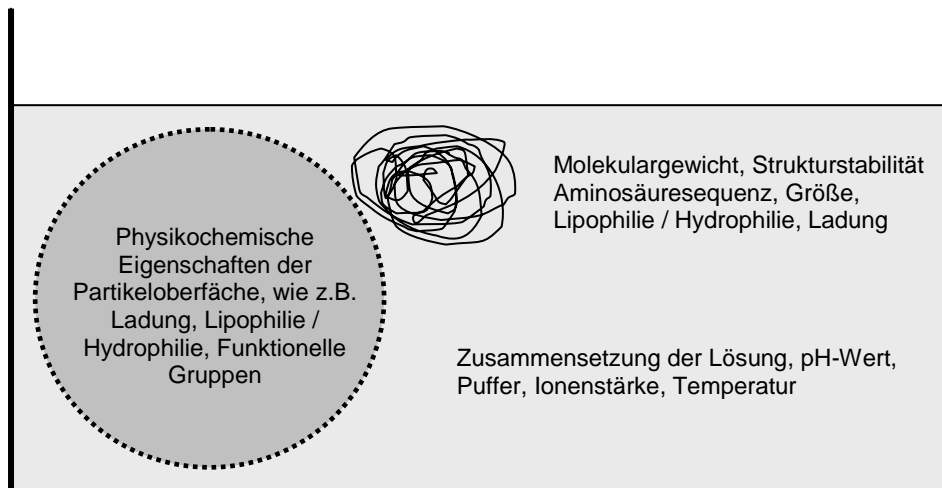


Abbildung 2.11: Einflussfaktoren auf die Proteinadsorption an Arzneistoffträger

Allerdings birgt die Proteinadsorption grundsätzlich Risiken. Durch den Adsorptionsvorgang kann es zu einer Veränderung der Proteinstruktur und damit unter Umständen zu einer Veränderung oder zum Verlust der Wirksamkeit des Proteins kommen. Das Ausmaß der Aktivitätsänderung hängt von vielen Faktoren ab und ist für jede Träger- / Protein-Kombination speziell zu untersuchen. Zur Strukturveränderung des Proteins kann es während der Anlagerung und Bindung an die Oberfläche des Trägermaterials oder auch erst deutlich später kommen. Je nach Stabilität der Bindung ist in unterschiedlichem Ausmaß eine Desorption des Moleküls möglich. Neben den Bindungspartnern haben die Begleitstoffe der Lösung einen wichtigen Einfluss auf die Desorptionsrate. Beispielsweise kann durch Zugabe von Tensiden, Erhöhung der Ionenstärke oder Veränderung des pH-Wertes eine Desorption gefördert werden (63), (64).

### 2.2.9 Mizellen

Für amphiphile Moleküle ist eine molekulardisperse Verteilung in Lösungen energetisch ungünstig. Bei sehr geringer Konzentration lagern sich die Moleküle zu Dimeren zusammen oder reichern sich in Grenzflächen an. In einer wässrigen Phase ordnen sich die Moleküle so an der Oberfläche an, dass sich ihre polaren, hydratisierten Gruppen im Wasser befinden, während die unpolaren Reste aus der wässrigen Phase herausragen und über Van-der-Waals-Wechselwirkungen stabilisiert sind. Eine Erhöhung der Tensidkonzentration ermöglicht den amphiphilen Molekülen, sich zu kolloidalen Assoziaten, den Mizellen, zusammenzulagern. In

hydrophilen Lösungsmitteln sind die polaren Gruppen der Außenseite der Mizelle zugewandt, alle unpolaren Reste der Tenside können im Innern der Mizelle in Wechselwirkung treten. Bei lipophilen Lösungsmitteln ist das Bild umgekehrt, es entstehen sogenannte inverse Mizellen, bei denen die Orientierung der polaren und unpolaren Molekülbereiche genau entgegengesetzt ist. Die Form und Größe der Mizellen hängen von den Stoffeigenschaften des Tensids und äußeren Einflüssen, wie Ionenstärke, pH-Wert, Temperatur und weiteren ab (65). Der Packungsparameter (P) ist der Quotient aus dem Volumen des lipophilen Molekülteils ( $V_l$ ) zum Produkt aus der Länge der Kohlenwasserstoffkette ( $L_l$ ) und der Fläche der polaren Kopfgruppe ( $A_h$ ). Anhand dieses Parameters kann für klassische Tenside eine Voraussage über die Form der Mizelle gemacht werden:

$$P = \frac{V_l}{A_h \cdot L_l}$$

$P < 0,33$	$0,33 < P < 0,5$	$0,5 < P < 1$	$P > 1$
Kugelige M.	Zylinderförmige M.	Bilayer und Vesikel	Inverse M.

Gleichung 2.21

Die Entstehung einer Mizelle ist ein komplexer Prozess hoher Reaktionsordnung. Ab einer bestimmten Tensidkonzentration, der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC), die für jedes Tensid charakteristisch ist, kommt es spontan zum Zusammenschluss von ca. 50 – 200 Molekülen zur Mizelle. Dieser thermodynamisch günstige Zustand ist durch ein Minimum der freien Enthalpie  $G$  gekennzeichnet. Treibende Kraft für die Entstehung einer Mizelle ist nicht die Enthalpie, sondern ein Entropiegewinn des Gesamtsystems (66). Um im Wasser gelöste hydrophobe Molekülbereiche des Tensids bildet sich eine Clathrathülle aus. In dieser sind die Wassermoleküle besonders hoch geordnet, um Wasserstoffbrücken mit sich selbst zu bilden, weil eine Wechselwirkung mit der unpolaren Oberfläche kaum stattfindet. Kommt es nun zur Ausbildung einer Mizelle, werden die hochgeordneten Wassermoleküle freigesetzt, und die Gesamt-Entropie steigt. Die in den meisten Fällen positive Mizellbildungsenthalpie  $\Delta H_M$  (üblicherweise 1 – 2 kJ / Mol) ergibt sich nach van't Hoff aus:

$$\Delta H_m = -n \cdot RT^2 \cdot \left( \frac{d \ln(cmc)}{dT} \right) \quad \text{mit } 1 < n < 2 \text{ je nach Ladung der Mizelle}$$

Gleichung 2.22

Voraussetzung für eine negative molare freie Mizellbildungsenthalpie  $\Delta G_M$  ist demzufolge eine Entropiezunahme ( $\Delta S_M > 0$ ), die sich in einer Größenordnung von ca.  $140 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  bei Raumtemperatur bewegt (3).

Sind unterschiedliche amphiphile Substanzen an dem Aufbau einer Mizelle beteiligt, handelt es sich um eine Mischmizelle, diese kann eine verbesserte Stabilität aufweisen (67). Beispielsweise wirken bei ionogenen Tensiden zwischen gleichartig geladenen Molekülen elektrostatische Abstoßungskräfte, dadurch können nur relativ wenig Tenside am Aufbau der Mizelle beteiligt sein (68). Die Stabilität, Größe und damit auch die Beladungskapazität können deutlich erhöht werden, wenn zwischen die ionogenen Tenside neutrale amphiphile Moleküle eingelagert werden (69), (70).

Eine wichtige Eigenschaft der Mizellen ist die Solubilisation von Substanzen. Durch die Aufnahme von Molekülen in das Innere einer Mizelle kann eine molekular- oder kolloidaldisperse Verteilung von im Lösungsmedium an sich schlecht löslichen Substanzen erreicht werden. Dies kann zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit des Arzneistoffs beitragen. Allerdings ist bei der Auswahl von Tensiden auf deren Verträglichkeit gegenüber Biomembranen und Geweben zu achten (71). Der Einsatz physiologisch gut verträglicher Tenside, beispielsweise Lecithin-Gallensalz-Kombinationen, ermöglicht insbesondere bei parenteraler Applikation eine Verbesserung der Gewebsspermeation bei guter Verträglichkeit der Formulierungen (72).

#### **2.2.10 Inversmizellare Lösungen (IML)**

Im Gegensatz zur Mizellbildung in wässrigen Medien stellt die Assoziation von Amphiphilen in lipophilen Lösungsmitteln im Allgemeinen einen kontinuierlichen Prozess dar. Bereits bei geringen Tensidkonzentrationen kommt es zur Bildung von Dimeren und Oligomeren (73). Mit ansteigender Konzentration von Amphiphilen findet ein schrittweises Anwachsen der Assoziate statt (74). Die Existenz einer CMC, an der es zu einem sprunghaften Anstieg der Anzahl an Assoziaten kommt, wird bei inversen Mizellen kontrovers diskutiert (75), (76). Der genaue Ablauf der Assoziatbildung kann allerdings bei unterschiedlichen Systemen sehr variieren. Auch geringe Änderungen der Zusammensetzung, insbesondere des Wassergehaltes oder äußere Parameter, können das Assoziationsverhalten deutlich beeinflussen.

Bei der Entstehung inverser Mizellen ist nicht der Entropiegewinn die treibende Kraft, sondern die Möglichkeit der hydrophilen Molekülbereiche im Kern der Mizelle untereinander in Wechselwirkung zu treten. Insbesondere die freiwerdende Enthalpie bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen stellt einen günstigen Effekt dar.

Pharmazeutisch können IML zur Verbesserung der Penetration schlecht permeierender Arzneistoffe eingesetzt werden (77). Darüber hinaus ist es möglich, mit einer IML applikationsinduzierte Retardformulierungen herzustellen. Das Prinzip dieser Arzneiform ist eine durch Kontakt mit Wasser hervorgerufene Phasentransformation der IML in einen lamellaren Flüssigkristall (78). Aus diesem erfolgt dann eine diffusionskontrollierte Freisetzung des Arzneistoffs. Diese Formulierung eignet sich für verschiedene Applikationswege, wie ophthalmologische (79) oder rektale Anwendung. Voraussetzung zur Ausbildung eines stabilen Flüssigkristalls ist eine begrenzte Wassermenge am Applikationsort.

### **2.2.11 Quillaja A und ISCOMs**

Quillaja A (QA) wird aus dem Extrakt der Pflanzenrinde von Quillaja Saponaria gewonnen. Es handelt sich um ein wasserlösliches Glycosid mit amphiphilem Charakter. Systematisch ist die Struktur den Bolaamphiphilen zuzuordnen, bei denen an ein hydrophobes Grundgerüst, in diesem Fall die Quillajasäure, zwei hydrophile Kohlenhydratreste gebunden sind (80), (81) (Abbildung 2.12). Als Triterpen liegt das Molekül in einer gekrümmten Form vor; zur konvexen Seite, mit lipophilem Charakter, zeigen die Methylgruppen, zur konkav gewölbten Seite sind die Carboxylat- und Hydroxylgruppen mit den Zuckerresten orientiert. Die pH-Abhängigkeit einiger Eigenschaften, beispielsweise der CMC, ist durch die freie Glucuronsäure zu erklären. Die im Handel erhältlichen Substanzen stellen immer Stoffgemische dar, bei denen zum einen die Zuckerreste in der Zusammensetzung variieren, zum anderen können je nach Aufarbeitung des Pflanzenextraktes weitere Verunreinigungen enthalten sein. Es wurde ein durchschnittliches Molekulargewicht von 1650 ermittelt (82).

In wässriger Lösung bildet QA ab einer Konzentration von 0,03% mizellare Strukturen (83), an deren Aufbau aufgrund der Molekülgeometrie relativ wenig Moleküle beteiligt sind. Trotzdem bestehen die Mizellen aus einem dichten hydrophoben Kern und einer ausladenden hydrophilen Hülle (82).

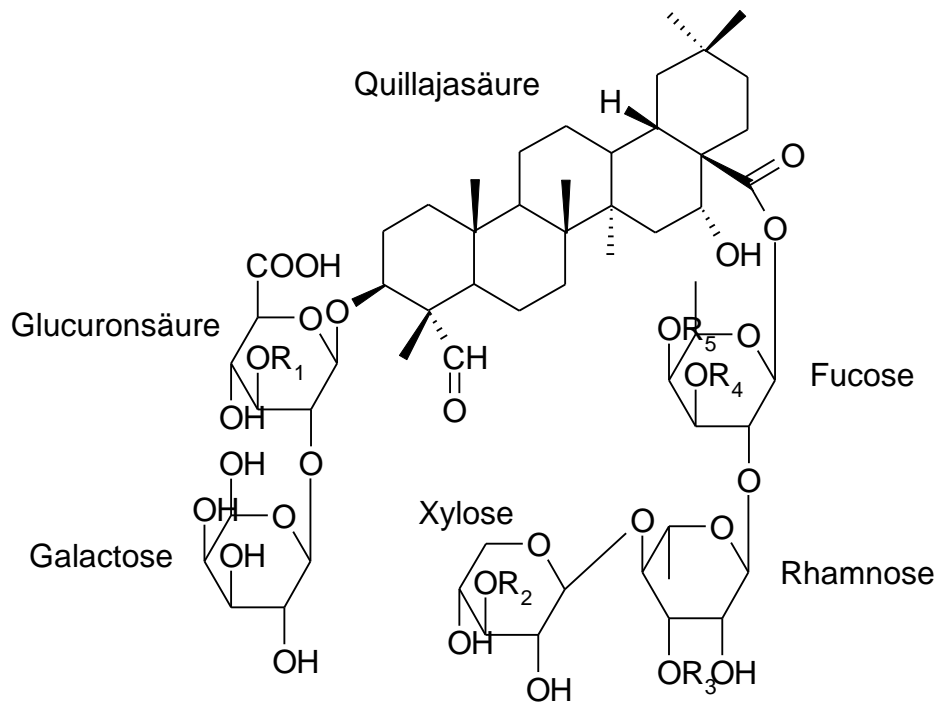


Abbildung 2.12: Grundgerüst des Quillajasaponins

QA kann als natürliches Tensid in der Lebensmittelindustrie zur Stabilisierung von Schäumen oder Emulsionen eingesetzt werden. Untersuchungen haben gezeigt (84), (85), dass QA mit Cholesterol relativ stabile Komplexe bildet. Aufgrund dieser Eigenschaft kann QA dazu benutzt werden, Cholesterol aus Lebensmitteln, beispielsweise Butter, zu entfernen.

In Kombination mit Phosphatidylcholin (PC) und Cholesterol kann QA unter anderem kugelförmige, käfigartige Strukturen mit immunstimulierenden Eigenschaften, sogenannte immunstimulierende Komplexe, (ISCOM)-Matrices bilden. Dabei handelt es sich um kolloidale Strukturen in einem Größenbereich zwischen 40 und 100 nm (86). ISCOMs haben, wie andere kolloidale Träger, den Vorteil einer langen Verweildauer und damit längeren Antigenpräsentation im Vergleich zu gelösten Antigenen. Außerdem kann die Immunogenität einiger Antigene durch Präsentation an der Oberfläche kolloidaler Träger gesteigert werden (87). In Untersuchungen (88) konnte die immunstimulierende Wirkung von QA belegt werden. Der Einsatz wasserlöslicher Adjuvantien zur Stimulation der Immunreaktion kann durchaus von Nebenwirkungen begleitet sein. Durch den Einsatz von ISCOMs, bei denen das QA Bestandteil der Lipidstruktur ist, kann die Effektivität verbessert und das Auftreten unerwünschter Begleiterscheinungen reduziert werden (89), (90), (91).

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Natrium-Diclofenac**

Das für die Stabilitätsuntersuchungen eingesetzte Natrium-Diclofenac (Mr 318,1) wurde in Ph.Eur. Qualität von der Firma Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland) bezogen. Therapeutisch wird es in unterschiedlichen Arzneiformen als nichtsteroidales Antiphlogistikum eingesetzt. Die Strukturformel ist in Abschnitt 2.2.5 dargestellt.

#### **3.1.2 Amphiphile Stärke**

HICAP100 (Ref.-Nr. 99CJI6573) vom Hersteller National Starch & Chemical (Manchester, United Kingdom) wurde für Stabilitäts- und Kompatibilitätsuntersuchungen eingesetzt. Es ist eine wasserlösliche, n-octenylsuccinatsubstituierte Stärke mit emulgierenden Eigenschaften. Der Hersteller gibt nur wenige Spezifikationen an: das Molekulargewicht liegt über 10000, der Substitutionsgrad liegt unter 3%. Diese chemisch modifizierten Wachsmaisstärken werden hauptsächlich zur Stabilisierung von Emulsionen und zur Verkapselung lipophiler Inhaltsstoffe eingesetzt.

#### **3.1.3 Wasser**

Zur Herstellung der untersuchten Systeme und Reagenzlösungen, zur Einstellung einer konstanten relativen Luftfeuchte in den Messampullen während einer IMC Messung und zur Verdünnung der Proben vor der Photonenkorrelations-spektroskopie wurde grundsätzlich bidestilliertes Wasser eingesetzt.

#### **3.1.4 Thiomersal und konserviertes Wasser**

Zur Konservierung wässriger Zubereitungen wurde Thiomersal zur Herstellung einer 0,005% Lösung eingesetzt. Diese Lösung wird im Folgenden als konserviertes Wasser bezeichnet. Es wurde in Qualität nach DAC 2000 von der Firma Caesar &

Loretz GmbH (Hilden, Deutschland) bezogen. Wässrige Reagenzien, wie beispielsweise Titrationslösungen, die zum sofortigen Verbrauch bestimmt waren, wurden nicht konserviert.

### 3.1.5 Softisan 154

Zur Herstellung der Lecithin-Hartfettmatrix wurde Softisan 154 von der Firma Condea (jetzt Sasol, Witten, Deutschland) verwendet. Es handelt sich um ein Triglyceridgemisch pflanzlichen Ursprungs.

Tabelle 3.1: Fettsäurezusammensetzung von Softisan 154

Fettsäuren	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	C20
Anteil [%]	0,1	0,1	0,7	1,4	49,5	47,4	0,1	0,4
Triglyceride	96%			Diglyceride 3,5%				

### 3.1.6 Phospholipon 90G

Bei dem als Coemulgator zur Herstellung von Lipidnanosuspensionen, Liposomen und inversemizellaren Lösungen verwendeten Lecithin handelt es sich um ein hochgereinigtes Sojalecithin, das von der Firma Phospholipid GmbH (Köln, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Nach Herstellerangaben liegt der Anteil an Phosphatidylcholin zwischen 92 – 98% (m/m). Der Gehalt an Lysophosphatidylcholin beträgt maximal 6%. Das durchschnittliche Molekulargewicht der Phosphatidylcholine liegt bei ca. 800 g/mol.

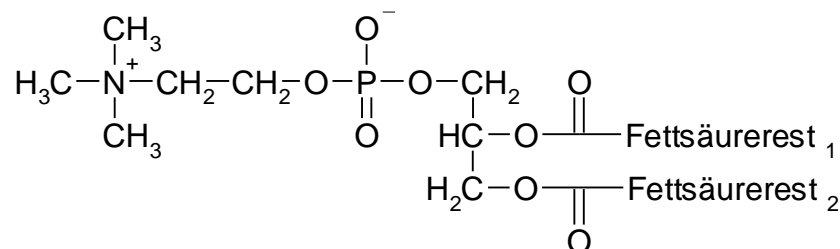


Abbildung 3.1: Strukturformel Phosphatidylcholin



Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Fettsäurereste von Phospholipon 90G

Fettsäure	Fettsäurerest 1	Fettsäurerest 2	Gesamtanteil
Palmitinsäure C16	24,0 %	1,7 %	12,9 %
Stearinsäure C18	7,9 %	1,0 %	4,4 %
Ölsäure C18:1	10,9 %	10,0 %	10,5 %
Linolsäure C18:2	52,4 %	80,6 %	66,5 %
Linolensäure C18:3	4,7 %	6,7 %	5,7 %

### 3.1.7 Phospholipon 90H

Im Gegensatz zum oben beschriebenen Lecithin handelt es sich beim Phospholipon 90H um ein bei Raumtemperatur festes, pulverartig vorliegendes Phosphatidylcholin mit nahezu vollständig hydrierten Fettsäuren. Der Anteil an Stearinsäure und Palmitinsäure liegt bei über 98%. Weniger als 2% sind ungesättigte Fettsäuren. Der Phosphatidylcholingehalt liegt bei mindestens 90%, der Lysophosphatidylcholinanteil beläuft sich auf maximal 4,0%. Laut Herstellerangaben liegt der Schmelzpunkt bei ca. 54 °C.

### 3.1.8 Solutol HS 15

Der zur Herstellung der Liposomen und Nanopartikeldispersionen eingesetzte Emulgator erfüllt die Anforderungen des Ph.Eur. gemäß der Monographie Macrogol-15-Hydroxystearat. Es handelt sich um ein physiologisch gut verträgliches (92), (93) nichtionisches Tensid, das auch für parenterale Zubereitungen geeignet ist. Der HLB-Wert liegt nach Angaben des Herstellers etwa bei 15, die CMC etwa bei 0,01%. Solutol HS 15 besteht zu ca. 30% aus ungebundenem Polyethylenglykol (PEG), das den hydrophilen Anteil darstellt, und zu etwa 70% aus den in Abbildung 3.2 dargestellten, lipophilen PEG-Mono- und Diestern der 12-Hydroxystearinsäure ( $x \approx y \approx 15$ ).

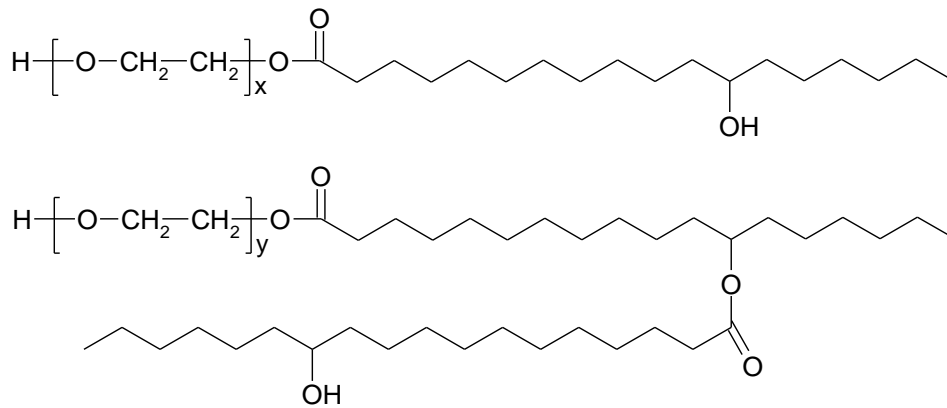


Abbildung 3.2: Strukturformeln der PEG-Ester der Hydroxystearinsäure

### 3.1.9 Bovines Serum Albumin (BSA)

Als Modelprotein zur Beladung der Nanopartikel wurde BSA ( $M_r \sim 66$  kDa) eingesetzt, das von der Firma SigmaAldrich (Seelze, Deutschland) nach Agarosegel-Elektrophorese als lyophilisiertes Pulver in einer Reinheit von  $\geq 98\%$  bezogen wurde. Zur Adsorption wurde, soweit nicht anders im Text erwähnt, eine 10%ige (m/V) BSA-Lösung eingesetzt.

### 3.1.10 Natrium-Dodecylsulfat

Für die Demizellarisierungsversuche wurde als ionisches Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS)  $M_r = 288,4$  g/mol Reinheit 99% von der Firma ACROS Organics New Jersey USA bezogen.

### 3.1.11 Polysorbat 20

Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)  $M_r = 1228$  g/mol wurde von der Firma ICI bezogen und als nichtionischer Emulgator für Demizellarisierungsuntersuchungen verwendet.

### 3.1.12 2-Propanol

Der Isopropylalkohol (IPA) zur Herstellung der Isopropylmyristat / IPA-Gemische wurde in Ph.Eur. Qualität von der Firma Riedel de Haen (Seelze, Deutschland) bezogen.

### **3.1.13 Isopropylmyristat**

Isopropylmyristat (IPM) ist der Isopropylester der Myristinsäure (C14). Es handelt sich um eine klare, lipophile, bei Raumtemperatur flüssige Substanz. Aufgrund des guten Spreitungsvermögens, der guten Hautverträglichkeit und toxikologischen Unbedenklichkeit wird IPM in der Kosmetik und halbfesten pharmazeutischen Zubereitungen als hautpflegender Zusatzstoff verwendet. Zur Herstellung der inversmizellaren Lösungen wurde IPM in Ph.Eur. Qualität von der Firma Henkel (Düsseldorf, Deutschland) bezogen.

### **3.1.14 Quil A**

Zur Untersuchung des Mizellbildungsverhaltens wurde das gereinigte Quillajasaponin Quil A (QA) von der Firma Accurate Chemical (Westbury, USA) bezogen.

## **3.2 Geräte und Methoden**

### **3.2.1 Isothermales Mikrokalorimeter**

Für die mikrokalorimetrischen Messungen wurde das isothermal arbeitende Wärmeleitungsmikrokalorimeter Thermal Activity Monitor 2277 (TAM) des Herstellers Thermometric (Järfälla, Schweden) eingesetzt. Mit diesem Gerät ist es möglich, Temperaturdifferenzen von nur  $10^{-6}$  °C zu erfassen, was einem Wärmestrom im  $\mu$ W-Bereich entspricht. Im Vergleich zur DSC ist durch eine ca. einhundertfach größere Probenmasse und einhundertfach höhere Messempfindlichkeit die Gesamt-empfindlichkeit um den Faktor 10.000 erhöht.

#### **3.2.1.1 Aufbau und Messprinzip des TAM**

Das Gerät besteht aus einem thermostatisierten 25 l Wasserbad, in das bis zu vier voneinander unabhängige Messzylinder eingesetzt werden können. Die Messzylinder beinhalten jeweils zwei Messkanäle – einen für die Probe und einen für die Referenz. Es werden immer Differenzmessungen im Wärmefluss zwischen Probe und der Referenz durchgeführt. Im Fall eines Wärmeflusses wird über Thermoelemente eine dem Wärmefluss proportionale Spannung erzeugt, die erfasst

wird und deren Verlauf in einem Rechner aufgezeichnet wird. Als Software zur Aufnahme und Auswertung wurde das Programm Digitam in den Versionen 2 und 4.1 genutzt. Im folgenden sollen die einzelnen Komponenten, soweit sie zum Messverständnis von Bedeutung sind, kurz dargestellt werden.

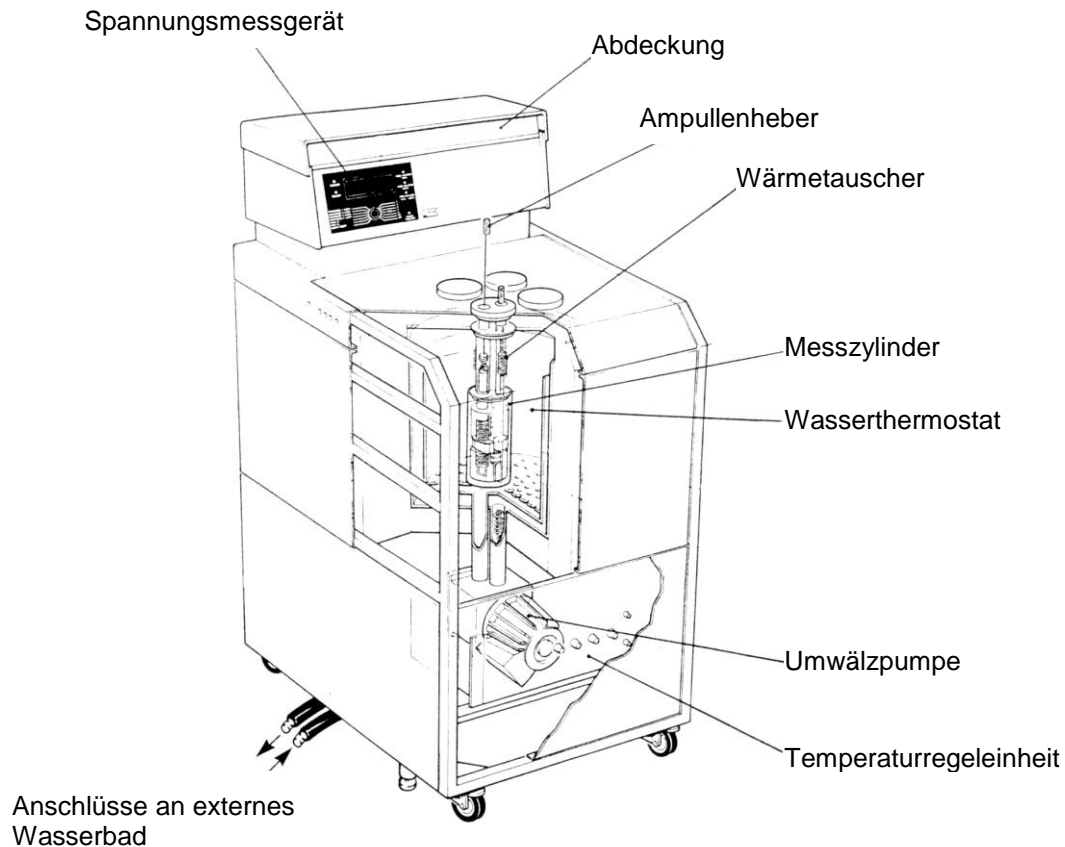


Abbildung 3.3: Hauptkomponenten des TAM (94)

### 3.2.1.1.1 Wasserbäder und Temperatureinstellung

Voraussetzung für die Untersuchung sehr kleiner Wärmeströme nach dem Wärmeleitungsprinzip ist eine konstante Temperatur des Messsystems. Diese Temperaturstabilität mit einer Abweichung von maximal  $2 \cdot 10^{-4} \text{ °C}$  wird durch ein thermostatisiertes 25 l Wasserbad erreicht. Das Wasser wird ständig durch eine Zirkulationspumpe mit einer Flussrate von 30 l/min. umgewälzt, so dass eine gleichmäßige Temperaturverteilung sichergestellt ist. Die Temperatur wird durch Thermistoren überwacht. Ein Aufheizen dieses Wasserbades erfolgt durch zwei unterschiedlich starke, elektrische Heizwiderstände – einen Vorheizer und einen

Feinheizer. Die Kühlung des Systems erfolgt durch ein externes Wasserbad, das über eine Schleife in einem Aluminiumblock in Kontakt mit dem internen Wasserbad steht. Die Temperatur des externen Wasserbades sollte so niedrig gewählt werden, dass die beiden Heizer des internen Wasserbades ständig mit geringer Leistung (zwischen 30 und 60% der Maximalleistung) nachheizen müssen. Die Temperatur des internen Wasserbades, die gleichzeitig die Probentemperatur während einer Messung darstellt, kann über einen vierstelligen Zahlencode zwischen 5 – 80 °C variiert werden.

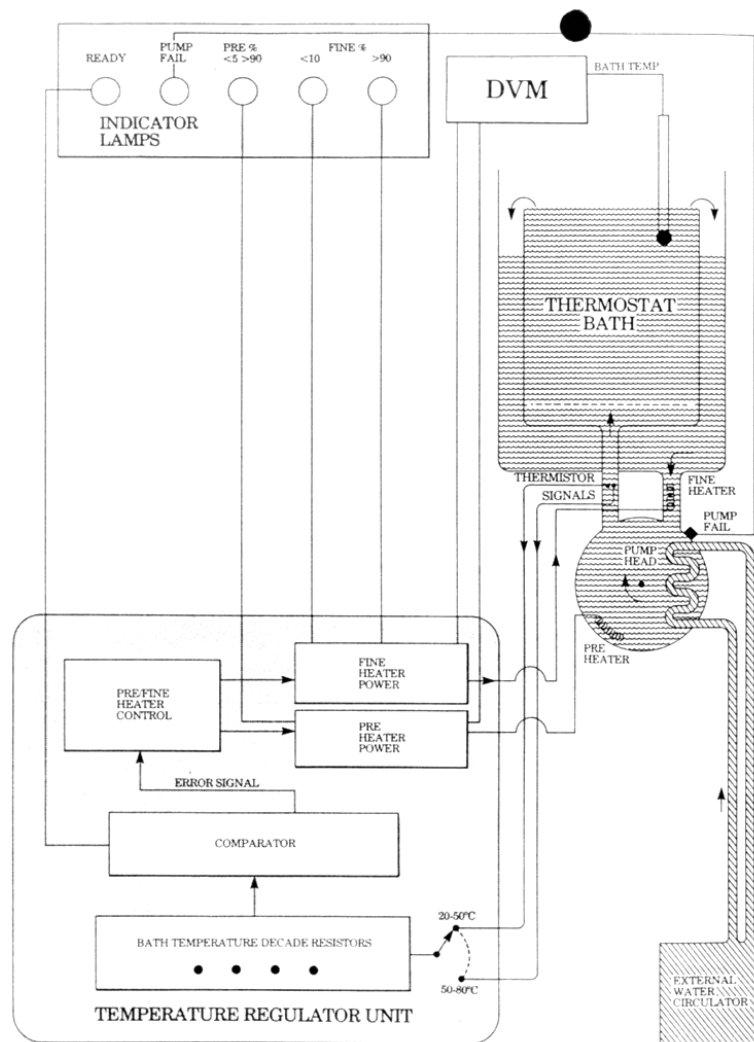


Abbildung 3.4: Aufbau des TAM (94)

### 3.2.1.1.2 Messzylinder und Messkanäle

In dem verwendeten TAM 2277 waren drei Messzylinder eingesetzt. Zwei Zylinder des Typs 201 und ein Messzylinder vom Typ 202. Dieser besitzt im Unterschied zum Typ 201 zwei Durchflussschleifen. Die beiden Messkanäle innerhalb der Zylinder weisen einen Durchmesser von 14 mm und einer Länge von 330 mm auf.

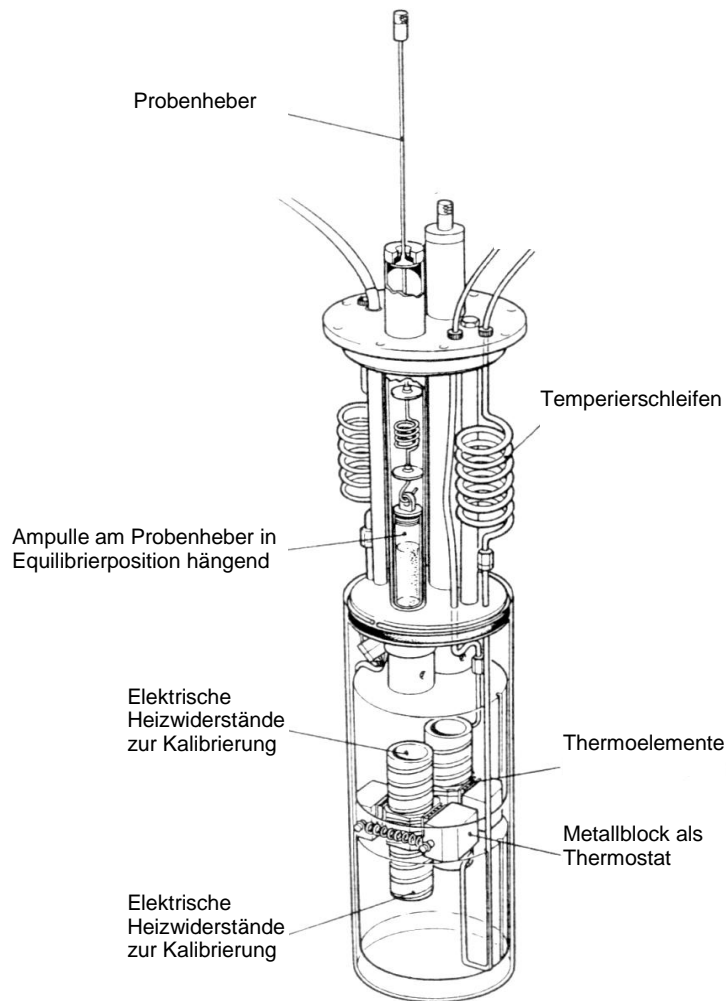


Abbildung 3.5: Aufbau eines Messzylinders (94)

Differenzmessungen zwischen Probe und Referenz haben den Vorteil, dass Messungenauigkeiten durch äußere Einflüsse, wie z.B. Druckschwankungen, minimiert werden, weil diese Effekte auf beide Kanäle einwirken. Als Probenbehälter für statische Messungen können 3 ml Glasampullen oder 5 ml Edelstahllampullen eingesetzt werden. Bei dynamischen Messungen, wie beispielsweise Titrations- oder Perfusionsmessungen, werden spezielle Messzellen in den Kanal eingeführt. Bevor die verschlossenen Ampullen in die Messposition der Kanäle hinabgesenkt werden, müssen sie je nach Masse, Art (Wärmekapazität) und Temperaturdifferenz zum Wasserbad für eine bestimmte Zeit in der Equilibrierposition verharren, damit eine genaue Temperierung gesichert ist. Beispielsweise benötigt eine mit 5 ml Wasser gefüllte Edelstahllampulle, einer Ausgangstemperatur von 25 °C, 45 Minuten Temperierzeit, um in der Equilibrierungsposition eine Messtemperatur von 37 °C zu erreichen (95). Das Positionieren der Ampullen innerhalb des Kanals erfolgt per Hand über einen sogenannten Probenheber. Beim Absenken der Ampullen in die

Messposition ist darauf zu achten, dass es zu möglichst wenig Reibung an der Innenwand des Messkanals kommt. Die würde zu einem deutlichen Störsignal führen und die Equilibrierungszeit verlängern.

### 3.2.1.1.3 Prinzip der Wärmeaufnahme

In der Messposition sind Probe und Referenz von Thermosäulen umgeben (vergleiche Abbildung 3.6). Diese Thermosäulen bestehen aus 72 in Reihe geschalteten Thermoelementen. Sie sind so angeordnet, dass ein Wärmeaustausch zwischen Probe und Wasserbad über diese Thermoelemente und daran befestigte Aluminiumblöcke erfolgt. Bei einer Temperaturdifferenz zwischen Ampulle  $T_0$  und Aluminiumblock  $T_1$  kommt es durch den Seebeck-Effekt (Gleichung 3.1) zum Auftreten einer Thermospannung  $U$  im Thermoelement (vergl. Abbildung 2.7), die der Temperaturdifferenz proportional ist. Die Seebeck-Koeffizienten  $\alpha$  und  $\beta$  geben die für das jeweilige Metall auftretende Spannung pro °C Temperaturdifferenz an.

$$U = \alpha \cdot (T_0 - T_1) + \beta \cdot (T_0 - T_1)^2$$

Gleichung 3.1

Die Temperaturdifferenz ist ebenfalls direkt proportional zum Wärmefluss  $dQ/dt$ . Der in Abbildung 3.6 dargestellte Messaufbau ist auf der Proben- und Referenzseite identisch. Als Messsignal wird eine durch den Wärmefluss auftretende Potentialdifferenz zwischen den Thermosäulen der Proben- und der Referenzseite erfasst. Somit wird nur dann ein Wärmefluss der Probe registriert, wenn dieser in der Referenz nicht auftritt (96).

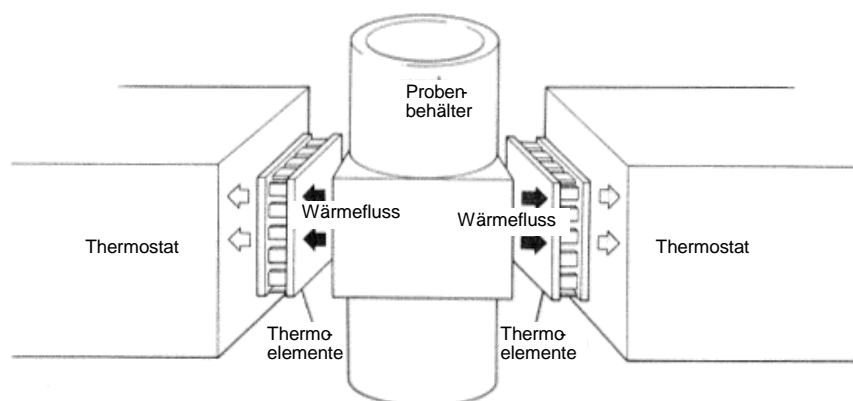


Abbildung 3.6: Prinzip des Wärmeflusses im TAM

#### 3.2.1.1.4 Basislinienstabilität

Voraussetzung für eine Messung oder Kalibrierung des Gerätes ist eine Konstanz der Basislinie. Vor einer Kalibrierung wird bei leerem Messzylinder ein Nullabgleich der Basislinie durchgeführt und die Konstanz der Basislinie für 1 Stunde überprüft. Von einer Stabilität der Basislinie ist auszugehen, wenn die Rauschamplitude unter 0,5  $\mu\text{W}$  liegt.

#### 3.2.1.1.5 Kalibrierung

Um absolute Wärmemengen mit einem Kalorimeter bestimmen und quantifizieren zu können, muss eine Kalibrierung des Gerätes erfolgen. Beim TAM können die einzelnen Messkanäle unabhängig voneinander kalibriert werden. Man unterscheidet zwischen einer internen Kalibrierung durch einen eingebauten Heizwiderstand und einer externen Kalibrierung mittels einer chemischen Reaktion bekannter Reaktionsenthalpie.

#### **Interne Kalibrierung**

Um die Probenaufnahmehalterungen ist ein 50  $\Omega$ -Heizwiderstand eingebaut. An diesen Heizwiderstand ( $R$ ) können Heizleistungen ( $P$ ) von 3, 10, 30, 100, 300, 1000 und 3000  $\mu\text{W}$ <sup>1</sup> angelegt werden.

$$P = R \cdot I^2 \quad (\text{mit } I = \text{Stromstärke})$$

*Gleichung 3.2*

Zur Ermittlung des Messbereiches und der benötigten Substanzmenge ist es sinnvoll, mit einer Übersichtsmessung über den gesamten Messbereich zu beginnen. Im Anschluss kann der Messbereich dann soweit eingeschränkt werden, dass der zu erwartende Maximalwert noch sicher innerhalb der Messgrenzen liegt. Entsprechend des Messbereiches soll auch die Kalibrierleistung ausgewählt werden.

#### **Statische Kalibrierung**

Nach Justierung der Basislinie wird zur statischen Kalibrierung der Heizwiderstand eingeschaltet. Wird nach einigen Minuten ein konstanter Wärmefluss detektiert, ist

---

<sup>1</sup> Die exakten Heizleistungen betragen 2.8, 9.9, 29.4, 99.7, 299.6, 997.2 und 2997.4  $\mu\text{W}$ .



der erreichte Maximalwert auf den Sollwert der gewählten Leistung einzustellen. Eine statische Kalibrierung wurde bei jeder Änderung der Messtemperatur, des Messbereiches oder nach Abschalten des TAM durchgeführt.

### **Dynamische Kalibrierung**

Prozesse, bei denen ein sehr rascher Wärmeaustausch stattfindet, beispielsweise bei Titrationen, werden nach statischer Kalibrierung nur verzögert dargestellt. Ursache hierfür ist die Trägheit der Wärmeübertragung von der Probe bis zum Peltier-Element. Interessieren nicht nur die übertragenen Wärmemengen, sondern die genauen Wärmefluss-Zeit-Kurven, so muss für schnellablaufende Reaktionen eine rechnerische Korrektur des Signals vorgenommen werden. Hierzu wird vor der Messung mit dem Probengefäß eine dynamische Kalibrierung durchgeführt. Ist dieser Prozess gestartet, wird der Heizwiderstand zunächst mit 40% und später mit 95% der maximalen Wärmeflussmenge des gewählten Messbereiches belastet. Die Ansprechgeschwindigkeit des Thermoelementes wird überprüft und das System berechnet selbständig die Korrekturparameter.

### **Externe Kalibrierung**

Alternativ zur internen Kalibrierung kann zur Bestimmung exakter, absoluter Wärmemengen eine externe Kalibrierung anhand einer chemischen Reaktion bekannter Reaktionsenthalpie durchgeführt werden. Die Hydrolyse von Triacetin in einem Imidazol-Acetat-Puffer bei 25°C ist eine Reaktion, die oft zur externen Kalibrierung des TAM eingesetzt wird (97). Die Wärmeflusssignale werden zu bestimmten Zeiten aus dem Kurvenverlauf abgelesen und mit den Literaturwerten verglichen. Voraussetzung ist ein sofortiger Start der Messung nach Mischung der Substanzen. Nachteilig im Vergleich zur internen Kalibrierung sind der hohe Zeitaufwand von ca. 30 Stunden und eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit.

### **3.2.1.2 Probenvorbereitung und Messbedingungen**

#### *3.2.1.2.1 Statische IMC-Messungen*

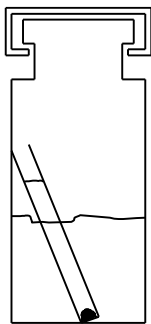
Zur Durchführung statischer Messungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, 3 ml Glasampullen verwendet, die verbördelt an einem Probenhalter in den Messkanal eingeführt wurden. Nach einer proben- beziehungsweise massenabhängigen

Equilibrierdauer konnte die Messung gestartet werden. Grundsätzlich wurde als Referenz eine leere Glasampulle verwendet. Bei flüssigen Proben über 0,5 g wurde eine der Probenmasse entsprechende Menge an Wasser beziehungsweise Dispersionsmedium in die Referenzampulle gefüllt.

### **Diclofenac und Amphiphile Stärke**

Für die Stabilitätsuntersuchungen von DfNa wurden 200 mg Arzneistoff in eine 3 ml Glasampulle gefüllt. Um Oberflächeneffekte weitgehend zu minimieren, wurde dabei auf eine ebene, glatte Oberfläche geachtet. Die Messungen erfolgten unter den Bedingungen der definierten Feuchte bei 20 °C beziehungsweise bei 40 °C in einem Kalibrierbereich von 300  $\mu$ W. Die Equilibrierungszeit betrug nach dem Verbördeln insgesamt 45 Min., 30 Min. in der Equilibrierposition und 15 Min. in der Messposition. Als Referenz wurde eine leere Glasampulle verwendet. Reine HICAP100 und Gemische gleicher Massenanteile mit DfNa wurden unter den gleichen oben angegebenen Bedingungen gemessen.

### **Einstellung definierter relativer Feuchten bei IMC-Messungen**



*Abbildung 3.7: Verbördelte  
Glasmessampulle mit befülltem  
Glasröhrchen zur Einstellung  
einer definierten rH.*

Um eine bestimmte relative Feuchte (rH) über der Probe während der IMC-Messungen zu erzeugen, wurde vor dem Verbördeln der Ampulle ein kleines Glasröhrchen zu der Probe gestellt. In diesem Röhrchen befand sich eine übersättigte Magnesiumchloridlösung zur Einstellung von 33% rH bei 20 °C beziehungsweise reines Wasser zur Einstellung von 100% rH. In beiden Fällen entstand noch innerhalb der Equilibrierungszeit eine definierte Feuchte in der Ampulle.

### **IMC-Messung der Lipidmatrices**

Zur Messung wurden 300 mg der bereits zuvor gemischten Lipidmatrix eingewogen und bei 80 - 90 °C geschmolzen. Nachdem die Probe innerhalb von circa 15 Minuten wieder auf 25 – 30 °C abgekühlt war, wurde die Glasampulle verschlossen und für 20 Minuten im TAM equilibriert. 10 Minuten nach Absenken in die Messposition

wurde die Messung bei 20 °C in einem Kalibrierbereich von 1000  $\mu$ W gegen eine leere Ampulle als Referenz gestartet.

### **IMC-Messung der SLN-Dispersionen**

2 g der SLN-Dispersionen wurden innerhalb von 5 Minuten nach der Hochdruck-homogenisation in die Glasampullen eingewogen. Die Equilibrierungszeit betrug insgesamt 30 Minuten. Die Thermogramme wurden bei 20 °C in einem Kalibrierbereich von 1000  $\mu$ W aufgezeichnet. Eine mit 2 g Wasser befüllte Ampulle diente als Referenz.

### **Stabilitätsuntersuchung der SLN- und Liposomendispersionen**

2 g der jeweiligen Dispersion wurden in Edelstahllampullen gefüllt. Die Messungen wurden bei 20 °C in einem Kalibrierbereich von 1000  $\mu$ W durchgeführt. Die Equilibrierungszeit betrug 45 Minuten, als Referenz diente eine mit 2 ml bidestilliertem Wasser gefüllte Edelstahllampulle. Diese Stabilitätsuntersuchungen wurden als Vorbereitung für die Titrationsmessungen durchgeführt, um die Stabilität der jeweiligen Zubereitung in einer Edelstahllampulle sicherzustellen. Titrationsmessungen können ausschließlich in Edelstahllampullen durchgeführt werden.

#### *3.2.1.2.2 IMC-Titrationsmessungen*

Zur Durchführung von Titrationsen während der Aufzeichnung eines Thermogramms stand eine Titrationseinheit zur Verfügung. Diese besteht aus einer 250  $\mu$ l Hamilton-Spritze, die in einen Titrierautomaten eingelegt wird. Der Automat kann manuell oder über die Digitamsoftware gesteuert werden. Eine Edelstahlkapillare stellt die Verbindung zwischen der Hamiltonspritze und der Messampulle, in der sich der Titrand befindet, her. Für Titrationsmessungen können ausschließlich 5 ml Edelstahllampullen verwendet werden. Diese sind Teil einer Titrationsmesszelle, die zur Messung schrittweise in den Messkanal hinabgesenkt wird. Durch einen in die Messampulle ragenden Turbinenrührer kann die Lösung während der Titrationsmessungen durchmischt werden. Bei den durchgeführten Messungen wurde grundsätzlich mit einer Geschwindigkeit von 20 Umdrehungen / Minute gerührt. Diese geringe Rotationsgeschwindigkeit reichte zur Durchmischung aus und führte zu keinem Wärmesignal im Thermogramm. Als Referenz wurde ebenfalls eine

Edelstahlampulle verwendet, die bei Titrandmengen von mehr als 0,5 g mit bidestilliertem Wasser befüllt wurde.

Dadurch, dass im klimatisierten Messraum eine Temperatur von 20 °C eingestellt war, war die Titrationslösung bereits grob vortemperiert. Zusätzlich wurde eine langsame Titrationsgeschwindigkeit und ein geringes Titrationsvolumen gewählt, so dass die Titrationslösung mindestens 20 Minuten Zeit zum Equilibrieren innerhalb der Zuleitungskapillare in der Titrationsmesszelle hatte, um Signale durch Temperaturschwankungen auszuschließen. Die Integration der Titrationspeaks erfolgte mit der Digitam 4.1 Software.

### **Beladung der SLN- und Liposomendispersionen mit BSA**

Zur Titration wurden 200 mg der jeweiligen Dispersion, deren Stabilität zuvor untersucht wurde, in Edelstahlampullen gefüllt. Unter Rühren der Dispersionen wurde frisch hergestellte, unterschiedlich konzentrierte BSA-Lösung zu der Dispersion titriert. Die Messtemperatur betrug 20 °C, die Equilibrierungszeit 45 Minuten, als Referenz diente eine leere Edelstahlampulle.

### **CMC-Untersuchung von SDS**

In einer Edelstahlampulle wurden 3 g Wasser vorgelegt und mit einer SDS-Lösung (50 mg / ml) in 16 Schritten von 12,88 µl titriert. Die Thermogramme wurden bei 25 °C in einem Kalibrierbereich von 30 µW aufgezeichnet. Die Equilibrierungszeit betrug 45 Minuten, als Referenz diente eine mit 3 ml bidestilliertem Wasser befüllte Edelstahlampulle.

### **CMC-Untersuchungen von Quil A**

In eine mit 3 g Wasser gefüllte Edelstahlampulle wurde eine Quil A Lösung mit variierenden Konzentrationen zwischen 0,3 – 1,5 % in Schritten von 12,88 µl bei 25 °C in einem Kalibrierbereich von 30 µW titriert. Die Equilibrierungszeit betrug 45 Minuten, als Referenz diente eine mit 3 ml bidestilliertem Wasser befüllte Edelstahlampulle.

### **Untersuchungen der inversmizellaren Lösungen**

Von den aus 70% IPM und 30% P90G (m/m) bestehenden inversmizellaren Lösungen wurden 2 g mit variierenden IPA/IPM-Verhältnissen und unterschiedlichen

Zugabemengen bei 20 °C in einem Kalibrierbereich von 1000 µW titriert. Die Equilibrierungszeit betrug 45 Minuten, als Referenz diente eine mit 2 ml IPM befüllte Edelstahllampulle.

### 3.2.2 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Für die Aufzeichnung der DSC-Thermogramme wurde ein Thermal Analysis System SSC 5200 des Herstellers Seiko (Tokyo, Japan) eingesetzt, welches aus folgenden Komponenten bestand: Kalorimereinheit DSC 220 C, Disk Station 5200H, Software MAS 5700 MA-Station Version 3.2. Die Apparatur wurde durch Schmelzen von Indium und Zinn jeweils in Bezug auf die Phasenübergangstemperatur und –enthalpie kalibriert.

Soweit nicht anders erwähnt, wurde an einer Mikrofeinwaage eine Probenmenge von 5 – 10 mg in einen Aluminiumtiegel eingewogen und mit einem Aluminiumdeckel kaltverschweißt. Auch bei dieser kalorimetrischen Methode wurde immer gegen einen Leertiegel als Referenz gemessen. Standardmäßig wurde eine Heizrate von 5 °C / Minute gewählt. Proben, bei denen von einem hohen Feuchtegehalt auszugehen war und bei denen die Messtemperatur 90°C überschritt, wurden in einem perforierten Tiegel vermessen, um ein Entweichen des Wasserdampfes zu ermöglichen. Störende Druckerhöhungen und Kondensationseffekte konnten damit vermieden werden.

Zur einfachen Beurteilung der Hartfettkristallinität wurde bei den Lipidmatrices und den daraus hergestellten Nanopartikeln aus den DSC-Schmelzenthalpien ein Kristallinitätsindex berechnet, der das Verhältnis der Kristallinität der jeweiligen Zubereitung zur Kristallinität des reinen Hartfetts als Bulk in Prozent ausdrückt. Durch Gleichung 3.3a erhält man den CI für die Lipidmatrix, durch 3.3b für die jeweilige SLN-Dispersion (98).

$$CI_{LM} [\%] = \frac{Enthalpie_{LM} [J/g]}{Enthalpie_{reines S154 \text{ unbehandelt}} [J/g]} \cdot 100$$

Gleichung 3.3a

$$CI_{SLN} [\%] = \frac{Enthalpie_{SLN} [J/g]}{Enthalpie_{reines S154 \text{ unbehandelt}} [J/g] \cdot 0.15} \cdot 100$$

Gleichung 3.3b

### 3.2.3 Thermogravimetrie (TG)

Die Messungen erfolgten mit dem TG/DTA 320 Modul des Thermal Analysis System SSC 5200, das gleichzeitig zur Differentialthermoanalyse geeignet ist. Eine Zweipunktkalibrierung des Gerätes erfolgte durch Schmelzpunktbestimmung von Indium und Zinn.

Der Feuchtigkeitsgehalt der DfNa Proben wurde mit Hilfe der Thermogravimetrie bestimmt. Hierzu wurden 5 – 13 mg Substanz in einen offenen Aluminiumtiegel gewogen. Anschließend wurde die Probe mit einer Heizrate von 5 °C / Min. auf eine Temperatur von 120 °C erwärmt. Diese Temperatur wurde bis zur Massenkonzanz beibehalten. Der Trocknungsverlust wurde ebenfalls mit Software MAS 5700 MA-Station Version 3.2 ermittelt.

### 3.2.4 Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)

Zur Untersuchung von Kristallgitterabständen der Nahordnung von Feststoffen mit der Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD) wurde ein Röntgengenerator PW1730/10 mit einer Röntgenröhre PW2213/25 eingesetzt, die bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einem Anodenstrom von 25 mA Röntgenstrahlung von  $\lambda = 0.1542$  nm Wellenlänge erzeugte. Die Substanzen wurden in einen Aluminiumträger eingestrichen bzw. eingeschmolzen und in einem Goniometer PW1025/50 über einen Bereich von 3,0° bis 33,0° [2 $\theta$ ] bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 0,015°/sec. vermessen. Alle Bauteile stammten vom Hersteller PANalytical (Eindhoven, Niederlande). Die Auswertung der Interferenzen nach der Bragg'schen Gleichung (vergl. Gleichung 3.4) zur Ermittlung der Gitterabstände erfolgte mit der Analysensoftware PC-APD der Firma Philips (Kassel, Deutschland).

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin\theta$$

Gleichung 3.4

Nach der Bragg'schen Gleichung ergibt sich der Gitterabstand  $d$  aus der Wellenlänge der Röntgenstrahlung  $\lambda$  und dem Glanzwinkel  $\theta$ ;  $n$  ist dabei die Ordnung der Interferenz.

WAXD-Messungen flüssiger Systeme wurden mit einer Debye-Scherrer-Kamera PW 1024/10 aufgenommen, die an einen Generator PW 1830 mit einer PW 2253/11 Röhre (Ni-Filter,  $\text{CuK}_{\alpha}$ -Strahlung) angeschlossen war, von Philips (Kassel, Deutschland). Die Hochspannung betrug 40 kV und der Anodenstrom 40 mA. Die Substanzen wurden in eine Glaskapillare gefüllt und über 12 Stunden vermessen. Die Detektion der Interferenzen erfolgt mit einem Agfa D7 FW Röntgenfilm. Die Gitterabstände wurden aus den Interferenzringen über die Bragg'sche Gleichung ermittelt.

### 3.2.5 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung von Systemen im nm Bereich, wie beispielsweise Liposomen oder SLN-Dispersionen, wurden zur Ermittlung des hydrodynamischen Durchmessers äquivalenter Kugeln PCS-Messungen durchgeführt. Verwendet wurde hierzu ein Zetasizer 3 von Malvern (Herrenberg, Deutschland), der mit einem He/Ne-Laser des Modells 127 von Spectra Physics (Mountain View, USA) ausgestattet war.

Die Systeme wurden vor der Messung mit filtriertem, bidestilliertem Wasser verdünnt, um Mehrfachstreuungseffekte zu vermeiden. Die Messungen erfolgten in einem Winkel von 90° zum Einstrahlaser in einer AZ10 Messzelle, die auf 20 °C temperiert war.

### 3.2.6 HPLC

Zur Untersuchung der chemischen Stabilität von Diclofenac-Natrium wurden HPLC-Messungen durchgeführt. Die HPLC-Anlage von Waters (Milford, USA) bestand aus folgenden Komponenten: einem 486 einstellbaren UV-Absorptionsdetektor, einem 717 plus Autosampler und zwei 515 HPLC-Pumpen. Als Trennsäule kam eine analytical Hypersil ODS (Partikelgröße 5  $\mu\text{m}$ ) Säule von 125 mm Länge und 4 mm Durchmesser zum Einsatz (Grom, Herrenberg, Deutschland). Steuerung und Auswertung erfolgte mit der Waters Millenium 32 Chromatography Manager Software.

Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus bidestilliertem Wasser / Acetonitril / Essigsäure (50/50/2) (V/V/V) und (60/40/0,1) (V/V/V) verwendet. Die Zusammensetzung wurde variiert, um eventuell auftretende Nebenpeaks zu

erkennen. Bei einer Flussrate von 1,6 ml/ min und einer Detektionswellenlänge von 276 nm ergaben sich für DfNa folgende Retentionszeiten: 50/50/2  $R_t \approx 3$  min und 60/40/0,1  $R_t \approx 10$  min. Eine lineare Korrelation zwischen Peakfläche und DfNa-Konzentration war im Konzentrationsbereich von 0,05 – 25 µg/ ml gegeben (Korrelationskoeffizient mit 0,999).

### **3.2.7 Tensiometer**

Die CMC Bestimmungen durch eine sprunghafte Änderung der Oberflächenspannung der jeweiligen Tensidlösung wurden an einem Tensiometer K100 MK1 von Krüss (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Für SDS und Polysorbat 20 wurde ein Probengefäß aus Glas mit einem Durchmesser von 50 mm und als Messkörper eine Wilhelmiplatte eingesetzt.

Zur Messung der QA-Lösung wurde ein 2 ml Teflontrog als Probengefäß und eine gekrümmte Platte PL02 als Messkörper eingesetzt. Alle Daten wurden mit der Software LabDesk aufgezeichnet.

### **3.2.8 Infrarotspektroskopie**

Die IR-Spektren von DfNa wurden mit Hilfe eines Kaliumbromidpresslings an einem Thermo Nicolet FTIR-200 Spektrometer aufgezeichnet.

### **3.2.9 Herstellung der Lipidnanopartikel**

#### *3.2.9.1.1 Herstellung der Lipidmatrix (LM)*

Ein binäres Gemisch aus 10 – 50% (m/m) P90G und 90 – 50% S154 wurde bei einer Temperatur von 80°C auf dem Magnetrührer bis zum Entstehen einer klaren, gelblichen Schmelze gerührt. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur unter Rühren entstand die für die Untersuchungen verwendete Lipidmatrix.

#### *3.2.9.1.2 Herstellung der Nanodispersion*

15 Teile der oben beschriebenen Lipidmatrix wurden mit 3 (alternativ 1,5 bzw. 7,5) Teilen Solutol versetzt und zu 82 (alternativ 83,5 bzw. 77,5) Teilen konserviertem



Wasser gegeben. Das Gemisch wurde auf 70 °C erhitzt und mit einem Ultra Turrax® (Ika, Staufen, Deutschland) bei 13000 U/min. für 5 Minuten dispergiert.

Direkt im Anschluss daran wurde die Voremulsion bei einer Temperatur von 50 °C und einem Druck von 1000 bar in einem EmulsiFlex-C5 Kolben-Spalt-Homogenisator des Herstellers Avestin (Ottawa, Canada) über 20 Zyklen hochdruckhomogenisiert. Nach der Herstellung wurde die Dispersion bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.2.10 Herstellung der Liposomendispersion**

Von P90G wurden entweder 2,5, 5,0 oder 7,5 Massenanteile in konserviertem Wasser (0,005% (m/V) Thiomersal) unter Rühren und Erwärmen auf circa 60 °C gelöst. Anschließend wurden 3 Teile Solutol hinzugefügt und mit konserviertem Wasser zu 100 Teilen aufgefüllt. Diese Mischung wurde einer Ultraschallbehandlung mit dem Soniprep 150 des Herstellers MSE Scientific Instruments (Sussex, Großbritannien) unterzogen. Nach 30 Zyklen aus 30 Sekunden Beschallung und 30 Sekunden Pause waren hauptsächlich uni-lamellare Liposomen entstanden.

### **3.2.11 Herstellung der BSA-Lösungen**

Die jeweilige Menge an BSA wurde mit konserviertem Wasser (0,005% (m/V) Thiomersal) versetzt. Nach einer Quellungszeit von circa 12 Stunden bei Raumtemperatur löste sich das BSA durch Aufschütteln.

### **3.2.12 Herstellung der inversmizellaren Lösung**

Ein binäres Gemisch aus 30 Teilen P90G und 70 Teilen IPM wurde bei einer Temperatur von 50 °C für circa 3 Stunden gerührt, bis eine klare Lösung entstanden war. Während des Erkalts auf Raumtemperatur wurde die Lösung weiter gerührt. Die IPA / IPM-Gemische wurden vor den IMC-Titrationsmessungen frisch hergestellt.

### **3.2.13 Prüfung auf signifikante Unterschiede von Mittelwerten (t-Test)**

Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte bei den Äquivalentdurchmessern der PCS-Messungen erfolgte mittels zweiseitigem t-Test unter der Annahme bzw. Ablehnung der Nullhypothese  $H_0$  mit  $\alpha = 5\%$  ( $\alpha$  = Irrtumswahrscheinlichkeit).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Stabilitäts- und Kompatibilitätsuntersuchungen von Natrium-Diclofenac (DfNa)

Die Ergebnisse dieses Abschnitts wurden in Zusammenarbeit mit Frau L. Baydoun erzielt. Teile der im folgenden aufgeführten Daten wurden bereits in ihrer Dissertation (99) veröffentlicht. Ergebnisse, die auf ihren Messdaten beruhen, sind durch die Abkürzung [Bay] gekennzeichnet.

In der Literatur (100) ist beschrieben, dass DfNa unter Einfluss von Feuchtigkeit, hoher Temperatur oder Oxidationsmitteln zersetzt werden kann. Bereits bei der Herstellung oder der Lagerung des Arzneistoffs kann es zu folgenden Zersetzungsreaktionen kommen:

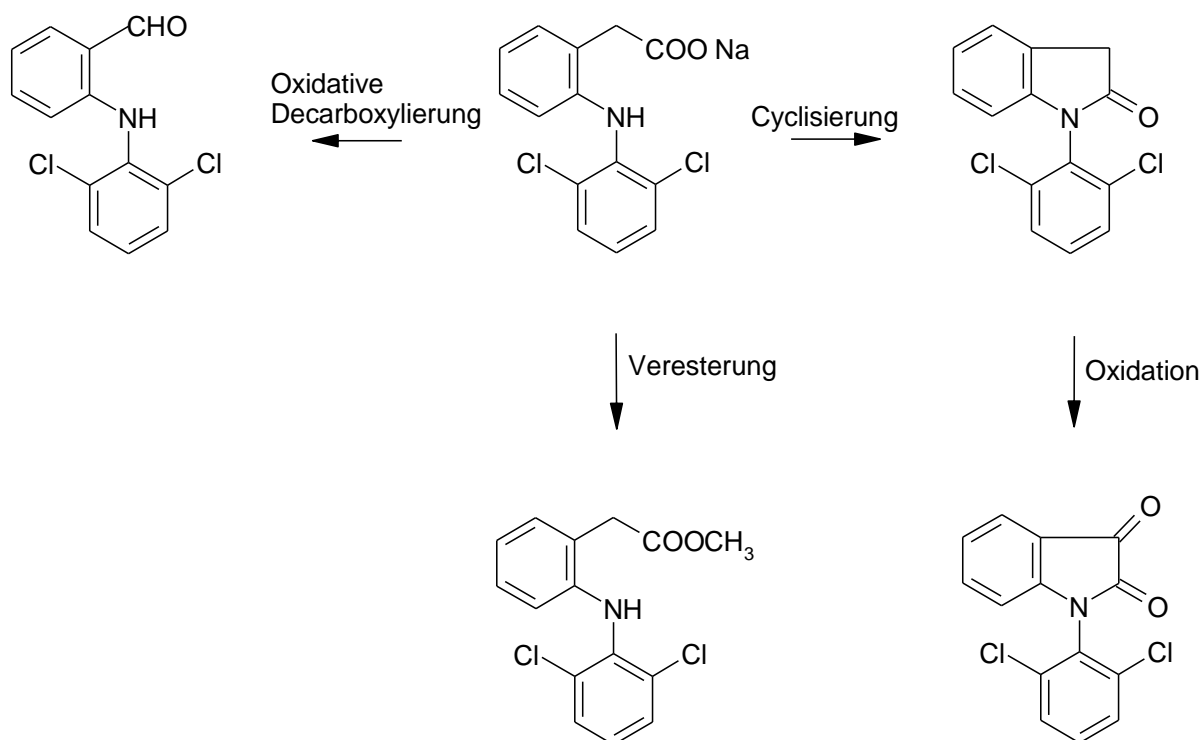


Abbildung 4.1: Zersetzungsprodukte von DfNa

Desweiteren ist in der Literatur (101), (102) die Bildung von Diclofenac-Hydraten bei Einfluss von Feuchtigkeit beschrieben. Im Folgenden soll überprüft werden, ob sich Veränderungen an der Substanz DfNa mikrokolorimetrisch erfassen lassen. Dazu

wurde die Substanz bei unterschiedlichen Temperaturen für sieben Tage mikrokcalorimetrisch untersucht.

#### 4.1.1 Lagerstabilität von Natrium-Diclofenac bei geringer Feuchte

Bei der Lagerung von DfNa unter üblichen Lagerungsbedingungen (20 °C, 33% rH) war im Thermogramm (Abbildung 4.2) kein Wärmefluss zu beobachten. Zur Überprüfung der chemischen Stabilität wurden nach 8 Tagen Lagerung HPLC-Untersuchungen durchgeführt [Bay]. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Ausgangssubstanz weder eine Veränderung der Peakfläche, noch kam es zum Auftreten von zusätzlichen Signalen. Desweiteren wurden Infrarotspektroskopische Messungen durchgeführt, auch hierbei waren keine Veränderungen im Spektrum zu erkennen.

#### 4.1.2 IMC Lagerstabilität von Natrium-Diclofenac bei 100% rH

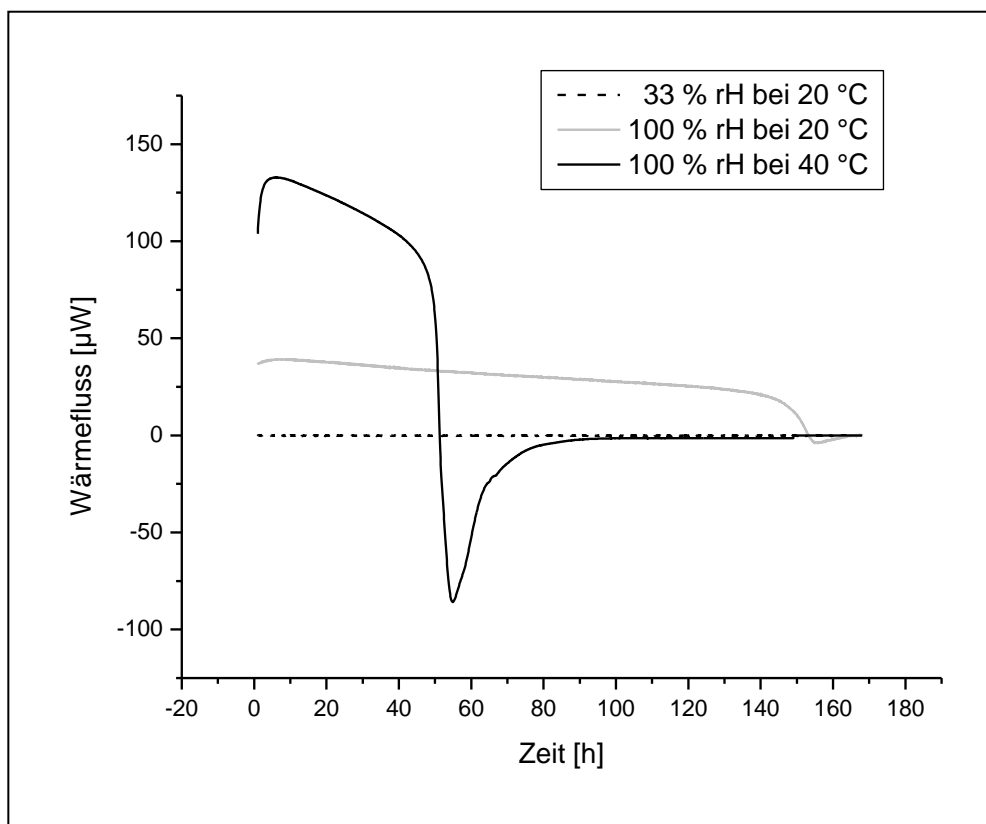


Abbildung 4.2: IMC-Thermogramme von DfNa bei unterschiedlichen Temperaturen und relativen Feuchten. (99)

Um eine Zersetzungsreaktion des Arzneistoffes zu provozieren, wurden die weiteren mikrokalorimetrischen Messungen bei einer relativen Feuchte (rH) von 100% durchgeführt. Bei einer Messtemperatur von 20 °C zeigte das Thermogramm einen exothermen Wärmefluss, der bereits kurz nach dem Starten der Messung sein Maximum von knapp 40  $\mu\text{W}$  erreichte. Während der folgenden 130 h kam es nur zu einem kontinuierlichen Absinken des Wärmesignals auf 22  $\mu\text{W}$ . Innerhalb der folgenden 24 h ging der Wärmefluss auf Null zurück.

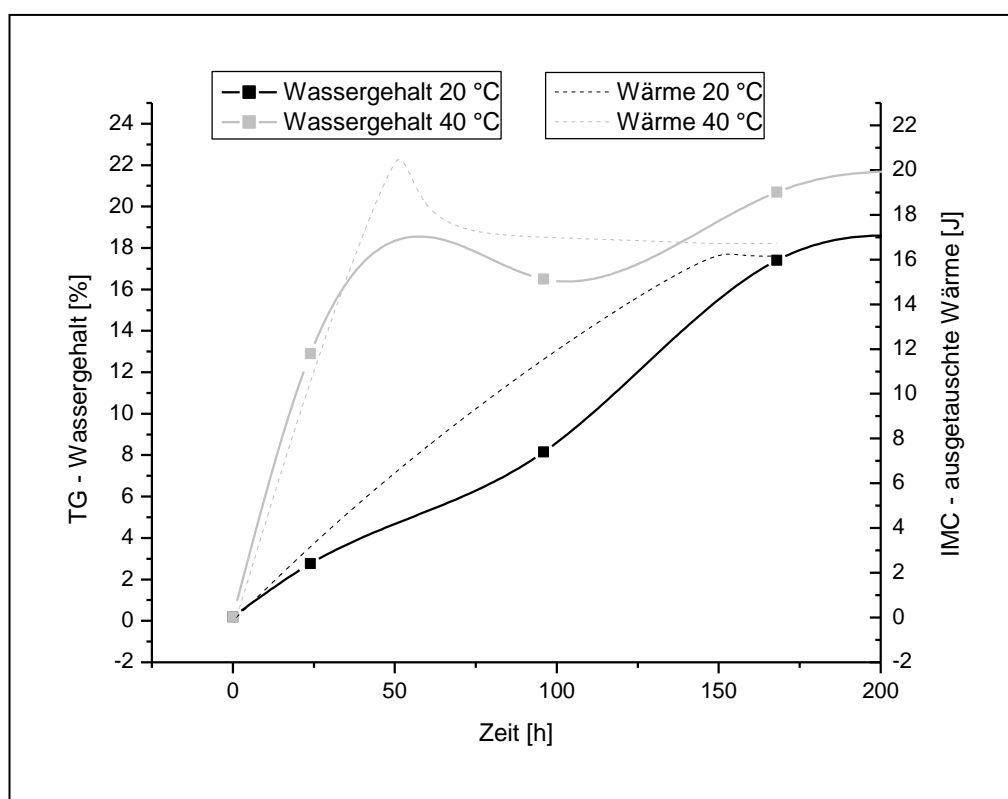


Abbildung 4.3: Während der IMC-Messung von DfNa aufgenommene Wassermenge und freigesetzte Wärme.

Führte man die Messung bei 40 °C und 100% rH durch, so zeigte sich ein veränderter Verlauf. Der Maximalwert lag bei fast 133  $\mu\text{W}$ , der lineare Abfall der Wärmeflusskurve fand nun auf 100  $\mu\text{W}$  innerhalb von 42 h statt. Im Anschluss daran kam es in den folgenden 12 h zu einem starken Abfallen der Kurve bis in den endothermen Bereich. In den folgenden 48 h ging der Wärmefluss auf 0  $\mu\text{W}$  zurück. Vergleicht man die Integrale der Thermogramme bei 20 und 40 °C (100% rH), so zeigt sich, dass die insgesamt ausgetauschte Wärme über den betrachteten Zeitraum bei beiden Temperaturen annähernd gleich ist (Abbildung 4.3). Dies deutet darauf hin, dass der Prozess, der den Wärmefluss verursacht, in gleichem Umfang

abläuft, wenn auch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Während der 7 Tage finden sowohl exotherme als auch endotherme Prozesse statt.

### **4.1.3 HPLC, IR, TG Ergebnisse der DfNa Lagerproben**

Die HPLC Untersuchungen der Proben nach einer Lagerdauer von 8 Tagen zeigten, dass es auch unter diesen Bedingungen zu keiner chemischen Veränderung von DfNa kam. Dementsprechend muss der Wärmefluss aus einer nichtchemischen Wechselwirkung der feuchten Luft mit dem Arzneistoff resultieren. Die IR-Messungen wurden durch den erhöhten Wassergehalt der Lagerprobe behindert, zeigten aber im Fingerprintbereich ebenfalls keine Veränderungen der Signale in Bezug auf Lage und Intensität.

Um die Mengen an aufgenommenem Wasser zu quantifizieren, wurden in bestimmten Intervallen thermogravimetrische Messungen durchgeführt. Nach 7 Tagen war sowohl bei 20 °C als auch bei 40 °C Lagertemperatur ein nahezu konstanter (spätere Messdaten nicht dargestellt), aber leicht unterschiedlicher Wassergehalt erreicht. Vergleicht man die ausgetauschte Wärme der kalorimetrischen Messung mit den durch die TG ermittelten Wassergehalten der Proben (Abbildung 4.3), so kann bei beiden untersuchten Temperaturen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der aufgenommenen Wassermenge und der freigesetzten Wärme festgestellt werden. Die Kurvenverläufe der aufgenommenen Wassermengen korrelieren bei beiden Temperaturen mit den Integralen der jeweiligen Wärmeflusskurven. Bei 40 °C Lagertemperatur verläuft die Wasseraufnahme schneller ab als bei 20 °C.

### **4.1.4 DSC Untersuchungen von DfNa**

Die Ausgangssubstanz DfNa zeigt bei einem Peakmaximum von 278 °C ein exothermes Wärmesignal, das in der Literatur unterschiedlich interpretiert wird. Palomo (103) und Chrisianah (104) beschreiben das Signal als exothermen Schmelzpeak der Substanz. Ribeiro (105) ordnet das Signal als polymorphen Phasenübergang ein und Tudja (106) vermutet eine oxidative Zersetzung von DfNa durch Luftsauerstoff. Der erste Erklärungsansatz – ein exothermer Schmelzvorgang – scheint eher unwahrscheinlich bei einer stark kristallinen Substanz. In der übrigen

Literatur wird der zwischen 282 und 289 °C folgende endotherme Peak als Schmelzen der Substanz gedeutet. Die bei höheren Temperaturen auftretenden exothermen Signale werden übereinstimmend als Zersetzung des DfNa angesehen.

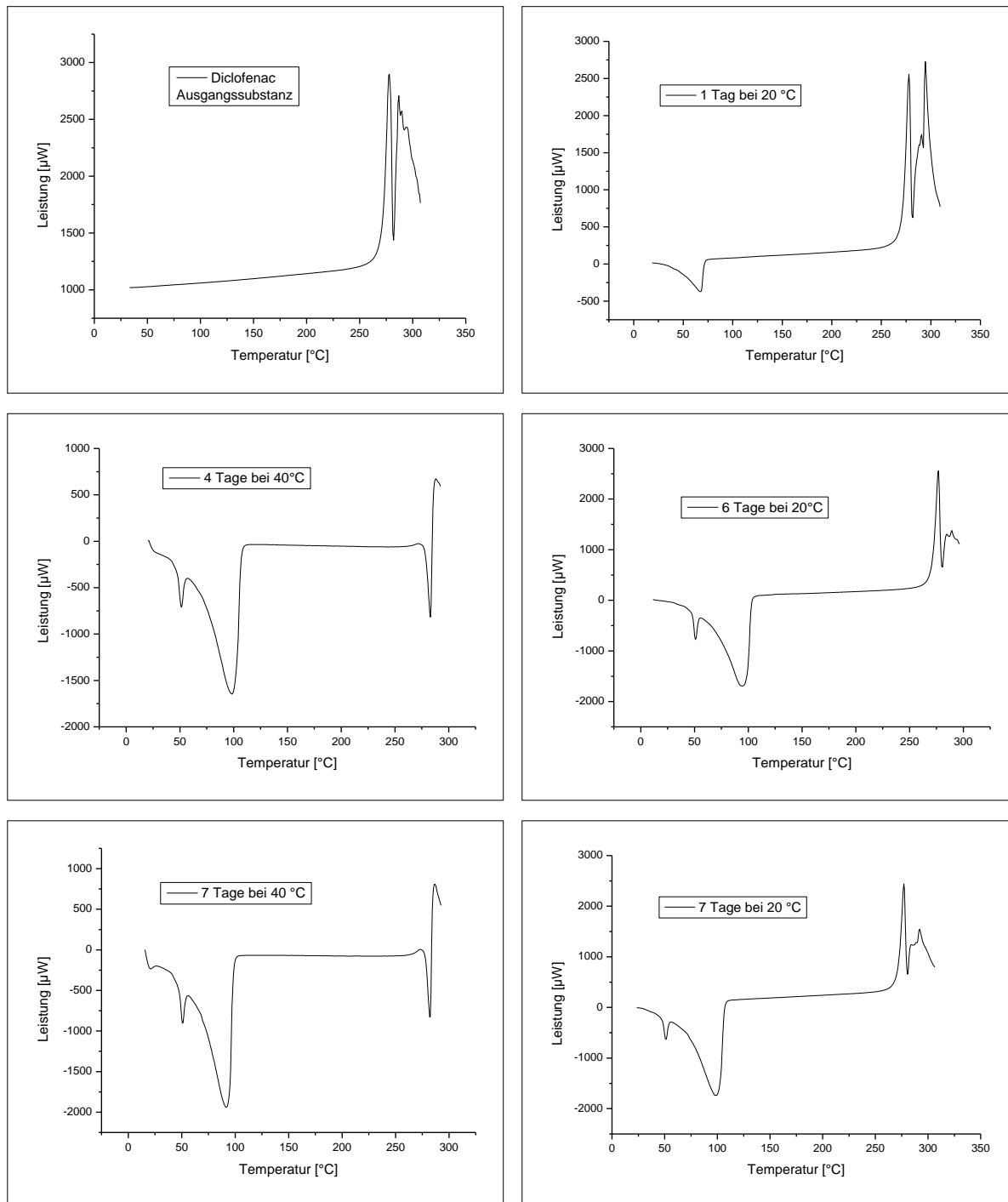


Abbildung 4.4: DSC-Thermogramme der DfNa-Proben nach unterschiedlicher Lagerdauer bei 100% rH (n=2) (99).

Während der Lagerung des Arzneistoffs unter den gleichen Temperatur- und Feuchtebedingungen, wie bei den jeweiligen TAM-Untersuchungen wurden DSC-Messungen der Proben durchgeführt. Dabei zeigen die in Abbildung 4.4 dargestellten Thermogramme der gelagerten Proben bei Messungen mit einem perforierten Tiegel im Bereich bis ca. 100 °C einen unsymmetrischen, endothermen Peak, der der Verdampfung von Wasser aus der Probe zugeordnet werden kann (107). Dieser wächst mit voranschreitender Lagerzeit und bildet ein zweites Maximum bei 50 °C aus. Die Differenzierung in zwei Maxima deutet darauf hin, dass das Wasser unterschiedlich stark in der Substanz gebunden ist. Die Zunahme der Peakflächen verläuft bei 40 °C schneller als bei 20 °C und stimmt mit der durch die TG bestimmten Wassermenge der Substanz und der mit der IMC ermittelten Wärmemenge überein. Auffallend ist, dass der exotherme Peak bei 277 °C bei einer Lagerung bei 40 °C nahezu verschwindet, obwohl er bei 20 °C Lagertemperatur bestehen bleibt. Der Schmelzpeak im Thermogramm bleibt unverändert.

#### **4.1.5 Röntgenweitwinkeldiffraktometrie der DfNa-Proben**

Kommt es in Folge einer Wasseraufnahme einer kristallinen Substanz zur Hydratation, so wird das Wasser als Kristallwasser in einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis fest in das Ionengitter miteingebaut. Daraus resultiert ein veränderter kristalliner Aufbau der Substanz. Um diese Änderungen der kristallinen Struktur zu verfolgen, wurden WAXD-Messungen während der Lagerung von DfNa unter den zuvor genannten Bedingungen durchgeführt. Die Diffraktogramme weisen bereits nach 24 h Lagerung Veränderungen in der Intensität der Reflexe auf. Innerhalb von 7 Tagen Lagerzeit kommt es zu einer deutlichen Veränderung der Beugungsreflexe (siehe Abbildung 4.5). Die Reflexe bei 6,8, 8,6, 11,4, 15,3 und 17,3 °2 $\theta$  verschwinden. Dagegen werden die Reflexe bei 20,2, 21,1 und 26,0 °2 $\theta$  verstärkt. Anstelle eines Reflexes bei 12,8 °2 $\theta$  treten bei dem Diffraktogramm der Hydratisierten Substanz nun vier Signale bei 12,93, 13,05, 13,41 und 13,61 °2 $\theta$  auf. Von den Beugungsreflexen bei 23,3, 23,6, 24,0 und 24,3 °2 $\theta$  bleibt nur der Beugungsreflex bei 24,0 °2 $\theta$  bestehen, und dies mit deutlich verminderter Intensität. Insgesamt verringerte sich die Intensität der Reflexe während der Lagerung. In Tabelle 4.1 sind die relativen Intensitäten einer Auswahl an Reflexen angegeben, die eine besonders starke Intensitätsveränderung im Verlauf der Lagerung bei 20 °C erfahren haben.

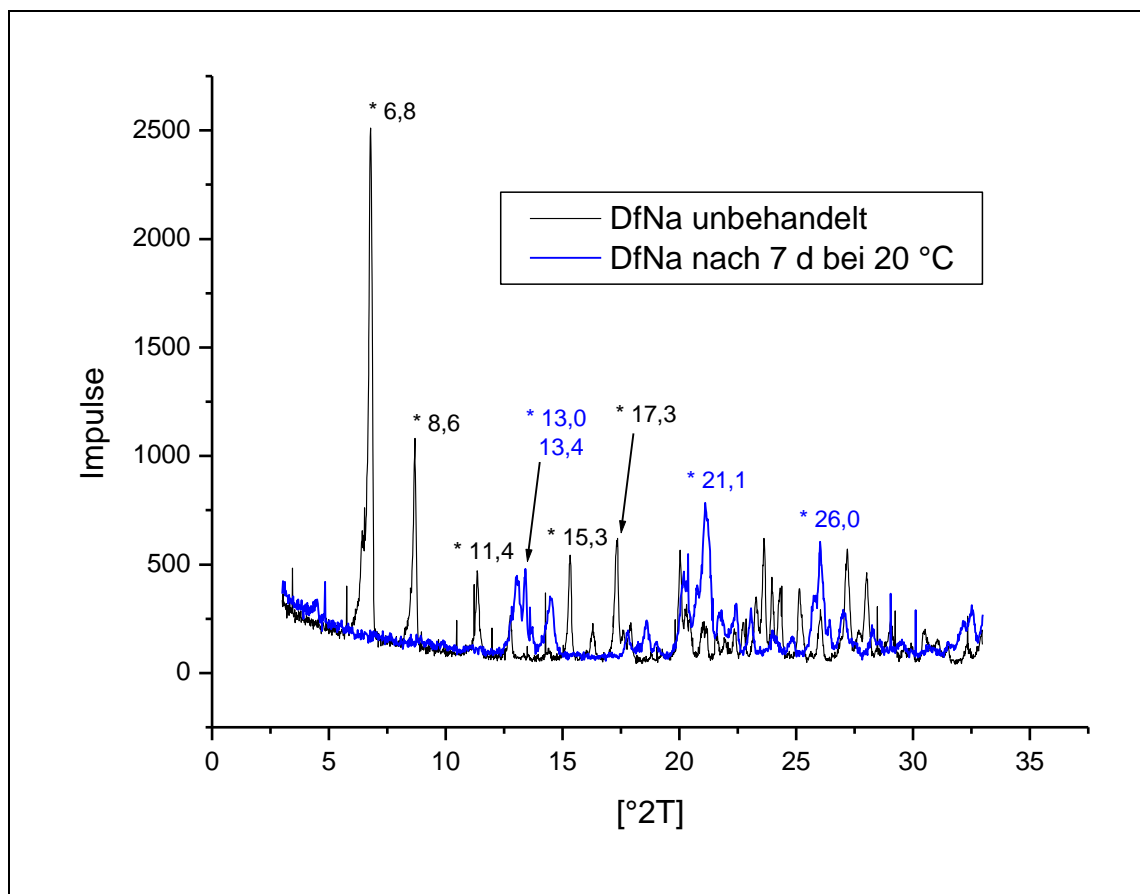


Abbildung 4.5: WAXD-Diffraktogramme vor und nach der Lagerung von DfNa bei 100% rH und 20 °C über 7 Tage.

Tabelle 4.1: Relative Intensitäten der Beugungsreflexe mit starker Intensitätsveränderung im Verlauf der Lagerung von DfNa ( $n=2$ )

		Winkel [ $^{\circ}2\theta$ ]					
		6,8	8,6	11,4	14,6	20,2	21,1
Lagerdauer [d]	0	100%	38,1%	16,6%	0%	9,8%	5,9%
	1	100%	34,7%	14,2%	0%	13,43%	8,3%
	4	100%	33,8%	12,73%	39,1%	27,97%	45,7%
	7	5,6%	1,75%	2,5%	46,7%	49,6%	100%

#### 4.1.6 Regeneration des DfNa-Hydrates durch Trocknung

Im Anschluss an die Hydratation wurde die Substanz unter verschiedenen Bedingungen getrocknet, um zu überprüfen, ob die Hydratation reversibel ist. Gute Trocknungsergebnisse mit einer Restfeuchte unter 0,3%, was dem Feuchtigkeitsgehalt der Ausgangssubstanz entspricht, wurden bei einer Temperatur von 100 °C



über 30 Min. erreicht. Bei Temperaturen unterhalb von 50 °C konnten diese Trocknungsergebnisse nicht erreicht werden. Beispielsweise hatte die Substanz nach einer Trocknungsdauer von 10 h bei 40 °C noch eine Restfeuchte von 1,3%. In Abbildung 4.6 ist zusätzlich zur TG Kurve auch deren Ableitung dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei einer Temperatur von 48 °C eine sprunghafte Veränderung des Trocknungsverlustes auftritt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der DSC, in deren Thermogrammen bei dieser Temperatur ein separater Peak zu erkennen ist. Es ist davon auszugehen, dass die Wassermoleküle unterschiedlich stark an DfNa gebunden sind und dass eine Temperatur von über 50 °C notwendig ist, um das gebundene Wasser vom DfNa vollständig abzulösen.

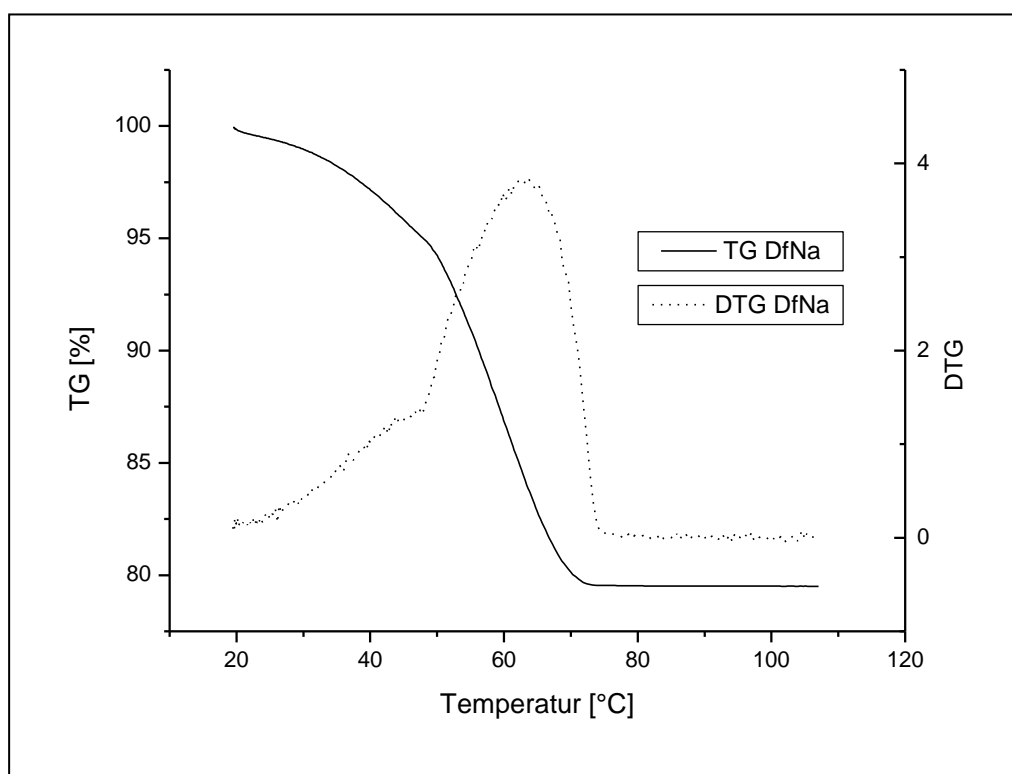


Abbildung 4.6: TG-Kurve und deren Ableitung des hydratisierten DfNa

Mit der getrockneten Substanz wurden erneut DSC- und WAXD-Untersuchungen durchgeführt. Die erhaltenen Thermogramme und Diffraktogramme stimmten mit der unbehandelten Ausgangssubstanz überein. Daraufhin wurde die getrocknete Substanz einer erneuten Hydratation im TAM unterworfen. Auch hier war der Verlauf der Messung übereinstimmend mit dem ersten Thermogramm. Der Prozess der Hydratation / Dehydratation ist demzufolge reversibel.

Untersuchungen mit Variation der Probenmenge zeigten, dass die Hydratationsgeschwindigkeit von DfNa stark von der vorhandenen Oberfläche abhängt. Eine größere Substanzmenge benötigt bei gleicher wechselwirkender Oberfläche erheblich mehr Zeit, bis die Hydratation vollständig abgeschlossen ist.

#### 4.1.7 Resultat der Stabilitätsuntersuchungen von DfNa

Die Ergebnisse zeigen, dass DfNa innerhalb des untersuchten Zeitraums von acht Tagen auch bei sehr aggressiven Lagerbedingungen keine chemische Veränderung erfährt. Hingegen kann die Bildung eines Hydrates während einer Lagerung bei 100% relativer Feuchte nachgewiesen werden. Nach Gleichung 4.1 ergibt sich bei einem Molekulargewicht ( $Mr_{\text{Subst.}}$  von 318,1 g/mol) für DfNa und einem Trocknungsverlust (TV) von 17% die Bildung eines Tetrahydrates in Übereinstimmung mit (26):

$$X_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{Mr_{\text{Subst.}} \cdot 100}{(100 - TV[\%]) \cdot Mr_{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{Mr_{\text{Subst.}}}{Mr_{\text{H}_2\text{O}}}$$

Gleichung 4.1

Die molare Verdampfungsenthalpie [kJ/mol] von Wasser kann im Temperaturbereich von 0 – 200 °C mit der empirischen Beziehung gemäß Gleichung 4.2 (108) auf Basis der Clausius-Clapeyronschen Gleichung berechnet werden:

$$H_V = 50,09 - 0,9298 \cdot \frac{T}{1000} - 65,19 \cdot \left( \frac{T}{1000} \right)^2$$

Gleichung 4.2(108)

Diese Verdampfungsenthalpie muss zum Verdampfen des Wassers aufgewendet werden. Im DSC-Thermogramm entspricht das endotherme Signal zwischen 40 und 105 °C der Entfernung des Wassers aus dem DfNa. Unter Berücksichtigung des Wassergehaltes von 17 – 19% im vollständig hydrierten DfNa ergibt sich bei einer Peakenthalpie der hydrierten Substanz von  $748,1 \pm 14,3$  mJ/mg eine Enthalpie im Bereich von 3,74 – 3,94 J/mg<sub>H<sub>2</sub>O</sub>. Damit liegt die Enthalpie im Mittel um +1,5 J/mg<sub>H<sub>2</sub>O</sub> über der molaren Verdampfungsenthalpie von Wasser in diesem Temperaturbereich (2,26 J/mg<sub>H<sub>2</sub>O</sub> bei 100 °C). Diese zusätzliche Energie muss aufgewendet werden, um das Wasser aus der Hydratbindung des DfNa zu lösen.

Es gibt viele unterschiedliche Bindungsmechanismen bei der Aufnahme von Wasser. In Tabelle 4.2 sind die wichtigsten Bindungsarten von Wasser an und in festen Stoffen dargestellt.

*Tabelle 4.2: Übersicht der Bindungsmechanismen von Wasser an / in Feststoffen mit den entsprechenden Bindungswärmen (9).*

Bindungs- mechanismus	Haftwasser	Kapillarwasser grobkapillar mikrokapillar		Hydratationswasser, Quellungswasser	adsorbiertes Wasser	Hydratwasser, Kristallwasser	Konstitutions- wasser
Bindungswärme [mJ/mgH <sub>2</sub> O]	0	0	0 - 300	0 - 1000	100 - 3300	300 - 2200	1000 - 6000

Während der Lagerung des DfNa bei 100% relativer Feuchte kommt es zu unterschiedlichen Sorptions- und Bindungsprozessen des Wassers, die zum Teil parallel ablaufen. An der Partikeloberfläche zunächst durch Physisorption gebundenes Wasser erfährt während der Lagerung eine Umverteilung ins Innere des DfNa-Partikels. Das Wasser wird dort als Hydratwasser in die Kristallstruktur integriert. Dieser exotherme Vorgang trägt den größten Anteil am Wärmefluss während der IMC-Messung. Der endotherme Vorgang der Verdunstung des Wassers aus dem Konditionierungsglasröhrchen zur Aufrechterhaltung der relativen Feuchte wird im ersten Abschnitt der Messung durch die Bindungswärmen der unterschiedlichen Sorptionsprozesse kompensiert. Zum Ende der Sorptionsvorgänge überwiegen, insbesondere bei der Lagerung bei 40 °C, die endothermen Anteile des Vorgangs. Die IMC erlaubt zwar eine Verfolgung des Hydratationsvorgangs, da der Wärmefluss mit der Feuchtigkeitszunahme der Substanz korreliert. Allerdings erlaubt auch diese Methode keine Differenzierung der unterschiedlichen Vorgänge während der Hydratisierung, weil der Wärmefluss als Summensignal erfasst wird.

#### **4.1.8 IMC-Kompatibilitätsuntersuchung von DfNa mit HICAP100**

Wie bereits anfangs beschrieben, ist die IMC eine für Kompatibilitätsuntersuchungen gut geeignete Methode, weil sie die unterschiedlichsten Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Substanzen detektiert. Die Untersuchungen sind relativ einfach, wenn die einzelnen Bestandteile unter den gewählten Messbedingungen selbst keinen Wärmefluss zeigen. Bei der betrachteten Kombination aus DfNa und der amphiphilen Stärke (HICAP100) ist dies bei geringer Luftfeuchtigkeit auch der Fall – weder DfNa, noch HICAP100 und auch nicht die Kombination gleicher Massenanteile von beiden

Stoffen zeigen einen Wärmefluss. Somit kann die Kompatibilität leicht attestiert werden.

Ein komplizierteres Bild ergibt sich, wenn die Einzelsubstanzen bei den Umgebungsbedingungen einen Wärmefluss hervorrufen. Die in Abbildung 4.7 dargestellten Messungen wurden bei 100 % relativer Feuchte und 20 °C durchgeführt. HICAP100 zeigt innerhalb der ersten 8 Stunden ein kleines exothermes Wärmesignal, das im Zusammenhang mit der Adsorption einer relativ großen Flüssigkeitsmenge zu Beginn der Messung steht. Aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften nimmt die amphiphile Stärke innerhalb weniger Stunden größere Mengen an Wasser auf. Diese Adsorption ist im Thermogramm trotz der parallel ablaufenden Verdunstung aus dem wasserbefüllten Glasröhrchen als exothermes Signal zu erkennen (109). Etwa 20 h nach Messbeginn kommt es über weitere 40 h zu einem erneuten Anstieg und Abfallen des Wärmeflusses. Innerhalb dieser Zeit kommt es zur Quellung der amphiphilen Stärke in der sehr feuchten Atmosphäre. Dies stellt ebenfalls einen energiefreisetzenden Prozess dar. Nach Abschluss dieses Prozesses verläuft das Signal stabil bei  $-2 \mu\text{W}$ . Möglicherweise ist hierfür noch eine schwache Verdampfung des Wassers aus dem Glasröhrchen verantwortlich.

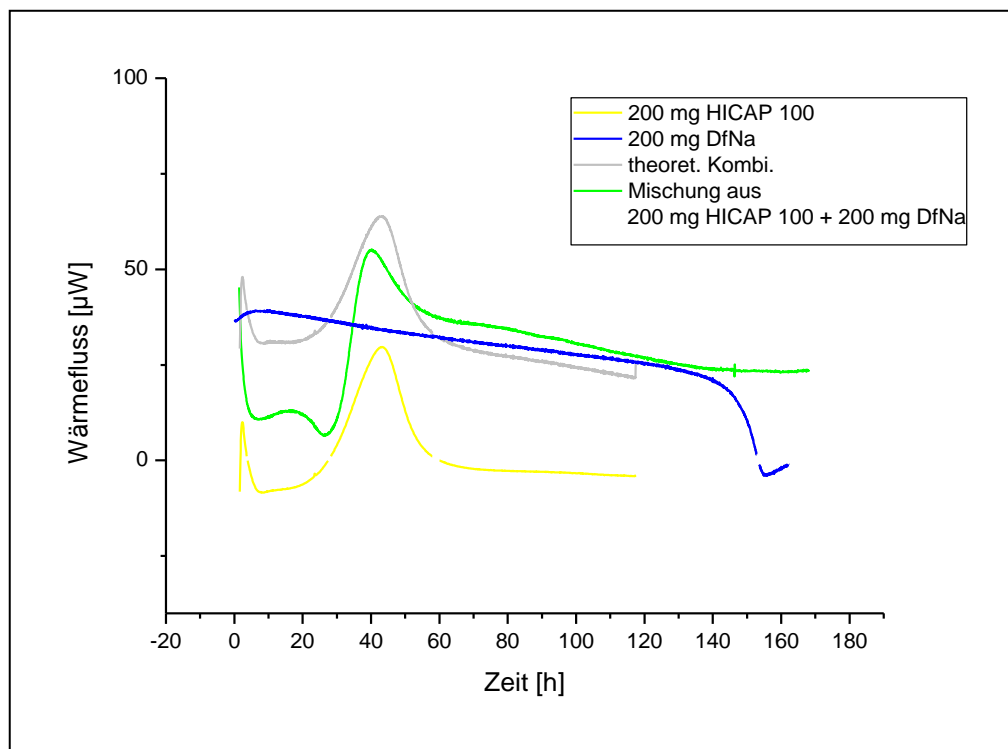


Abbildung 4.7: IMC-Thermogramme der Kompatibilitätsuntersuchung von DfNa und HICAP100 bei 100% rH und 20 °C

Das Gemisch von 200 mg DfNa und 200 mg HICAP100 zeigt bei 20 °C Messtemperatur zu Beginn der Messung einen reduzierten exothermen Wärmefluss, bedingt durch die Wasserverdunstung aus dem Glasröhrchen und möglicherweise verzögerte Adsorptionsvorgänge aufgrund der doppelten Probenmasse. Erst nach 29 h Messzeit kommt es zu einem Anstieg des Signals. Der Kurvenverlauf des Gemisches zeigt ab diesem Zeitpunkt keine deutlichen Abweichungen zum Verlauf der addierten Kurven der Einzelsubstanzen. Geringe Differenzen zum theoretisch zu erwartenden Kurvenverlauf sind damit zu begründen, dass die Hydratation eines Pulvergemisches z.B. aufgrund einer veränderten Porosität etwas anders verläuft, als rein additiv anzunehmen. Dementsprechend ist von einer Kompatibilität der Mischungspartner auszugehen.

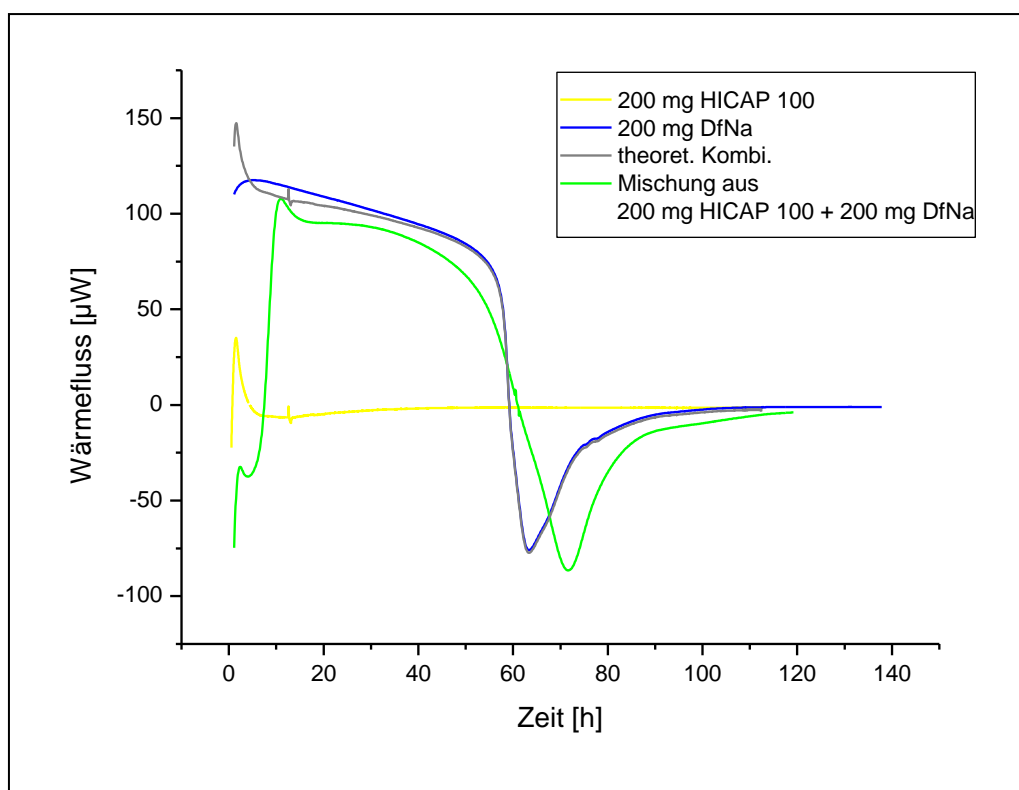


Abbildung 4.8: IMC-Thermogramme der Kompatibilitätsuntersuchung von DfNa und HICAP100 bei 100% rH und 40 °C

Bei 40 °C Messtemperatur zeigt sich ein entsprechender Messverlauf (vergl. Abbildung 4.8). Die DfNa-Hydratation läuft aufgrund der erhöhten Temperatur beschleunigt ab. Auch bei dieser Temperatur zeigt die additive Mischung von DfNa und HICAP100 [Bay] eine gute Übereinstimmung zu der theoretischen Addition der Einzelkurven, so dass auch hier von einer Kompatibilität auszugehen ist. Die leichte zeitliche Verschiebung ist wieder mit einer erhöhten Masse der Pulvermischung zu begründen.

## **4.2 Untersuchungen an Lipidmatrices und Lipidnanopartikeln (SLN)**

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Herrn M. A. Schubert erzielt und zum Teil bereits vorab veröffentlicht. Sie sind daher auch Bestandteil seiner kumulativen Dissertation (110). Ergebnisse, die auf seinen Messdaten beruhen, sind durch die Abkürzung [Schu] gekennzeichnet.

Im vorliegenden Kapitel soll die Einsatzmöglichkeit der IMC zur Beschreibung der Matrixkristallisation untersucht werden. Als Matrix wurde eine Hartfettmischung (S154) bestehend aus Triglyceriden gesättigter C16 und C18 Fettsäuren eingesetzt, in der Phospholipon 90G (P90G) bis zu einem Massenanteil von 50% der Schmelze gelöst wurde. Dabei bildete sich zunächst eine invers mizellare Lösung (IML), die dann zur Matrix erstarrte bzw. aus der im noch flüssigen Zustand durch Hochdruck-homogenisation eine Nanosuspension hergestellt wurde (vergleiche 3.2.1.9.2). Als Standardmethoden zur Charakterisierung des Kristallisationsverhaltens von Hartfetten wurden Ergebnisse aus DSC- und WAXD-Untersuchungen herangezogen. Die Partikelgrößenmessungen an Nanosuspensionen wurden im Nanometerbereich mit PCS, im Mikrometerbereich mit Laserlichtstreuung durchgeführt (111).

### **4.2.1 Kristallisationsverhalten von Lipidmatrices**

#### **4.2.1.1 IMC-Untersuchungen**

In diesem Abschnitt wird das Kristallisationsverhalten von zur SLN-Produktion eingesetzten Lipidmatrices dargestellt. Der P90G Anteil in der Lipidmatrix wurde variiert. Die Thermogramme zeigten einen Wärmefluss während der Rekristallisation der Lipidmatrix. Aufgrund der Equilibrierungszeit von 30 Minuten bei 20 °C für die IMC- Messungen konnte die Anfangsphase der Rekristallisation mit dieser Methode nicht erfasst werden.

Die Thermogramme (Abbildung 4.9) der verschiedenen Lipidmatrices unterscheiden sich deutlich voneinander. Systeme mit einem hohen P90G Anteil zeigen ein anfangs sehr stark abfallendes exothermes Wärmesignal, das der Kristallisationswärme zuzuordnen ist. Bevor die Kristallisation abgeschlossen ist, kommt es bei der Zubereitung mit 50% Lecithin bereits nach 4 h zu einem Anstieg des Wärmesignals mit einem Maximum von 104  $\mu$ W nach knapp 12 h. In den darauf folgenden 24 h fällt

das Signal auf nahezu Null ab. Der erneute Anstieg des Wärmesignals deutet auf eine Änderung der Modifikation hin, bevor die Kristallisation vollständig abgeschlossen ist. Da die neu gebildete Modifikation einen energetisch günstigeren Zustand der Matrix darstellt, wird bei dem monotropen Übergang Wärme freigesetzt. Mit abnehmendem P90G Anteil zeigen die Rezepturen in der Anfangsphase einen etwas flacheren Abfall der Wärmeflusskurve, was auf eine leicht verzögerte Rekristallisation hindeutet. Der Wiederanstieg des Wärmesignals verläuft mit geringerem Lecithingehalt flacher und findet zu einem späteren Zeitpunkt statt. Die

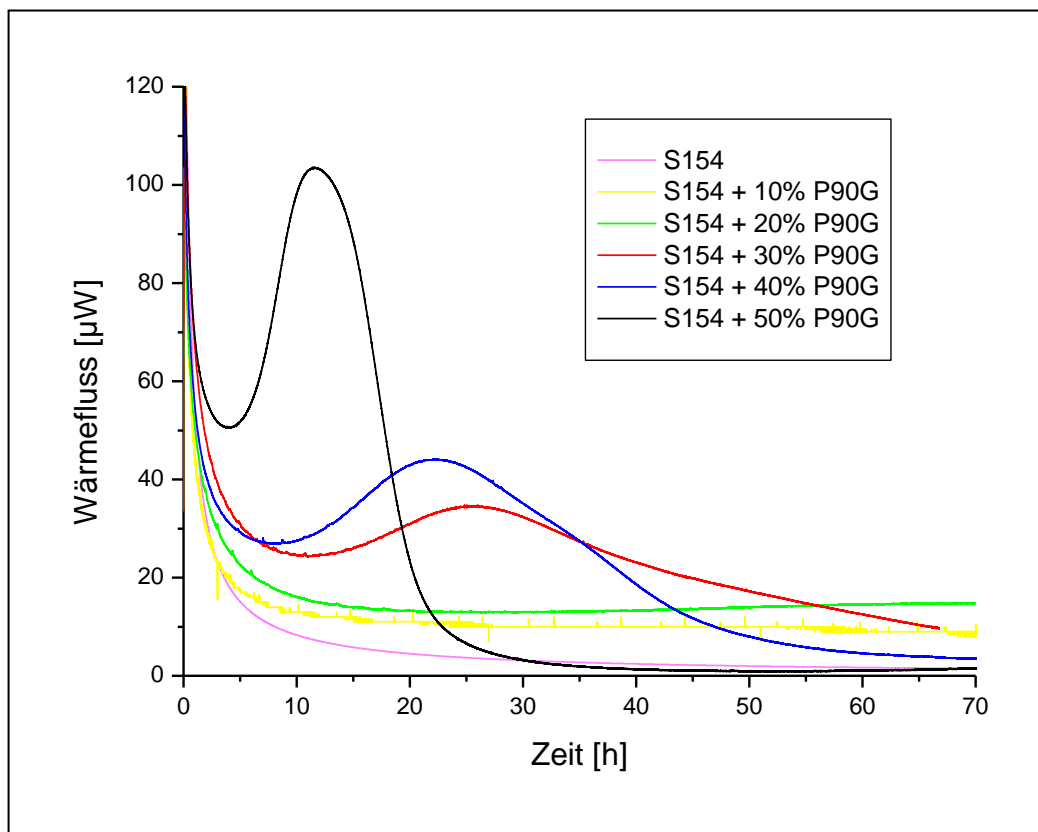


Abbildung 4.9: IMC-Thermogramme der unterschiedlich zusammengesetzten Hartfett-P90G-Mischungen ( $n=3$ ), (98)

Modifikationsänderung läuft zeitlich verzögert ab. Bei einem P90G Anteil von 10% (m/m) und bei der lecithinfreien Matrix ist eine spätere Zunahme des Wärmeflusses im untersuchten Zeitraum nicht mehr erkennbar. Je höher der P90G Anteil in der Matrix ist, desto schneller sinkt der Wärmefluss nach der Modifikationsänderung auf Null ab. Bei der Formulierung mit 50% (m/m) ist dies nach bereits 48 h der Fall, das System mit 20% (m/m) benötigt hierfür gut 180 h.

Wie in Abbildung 4.10 zu sehen, korreliert die Fläche unter den Peaks, die der Modifikationsänderung zugewiesen werden kann, mit dem Hartfettanteil der Lipidmatrix. Es ist deshalb davon auszugehen, dass das Ausmaß der Modifikationsänderung bei allen Rezepturen gleich abläuft.

Nach erfolgter Modifikationsänderung liegen die Systeme aber wahrscheinlich noch nicht in der stabilen  $\beta$ -Modifikation vor. Zumindest bei dem System mit 50% P90G Anteil konnte ab 75 h ein erneuter flacher Anstieg im Wärmefluss auf 3  $\mu\text{W}$  nach 98 h beobachtet werden (nicht in Abb. dargestellt), der voraussichtlich einer weiteren Modifikationsänderung zugeordnet werden kann. Aufgrund der sehr geringen Wärmeflüsse und langen Messzeiten wurde diese zweite Änderung nicht untersucht. Die  $\beta'$ -Modifikation und die  $\beta_1$ -Modifikation unterscheiden sich jeweils in ihrer Struktur und ihrem Energieniveau nur geringfügig von der  $\beta$ -Modifikation. Aus diesem Grund ist das Bestreben des Systems, in die stabile Modifikation überzugehen, relativ gering. Dies könnte eine Erklärung für den verzögerten Modifikationswechsel sein.

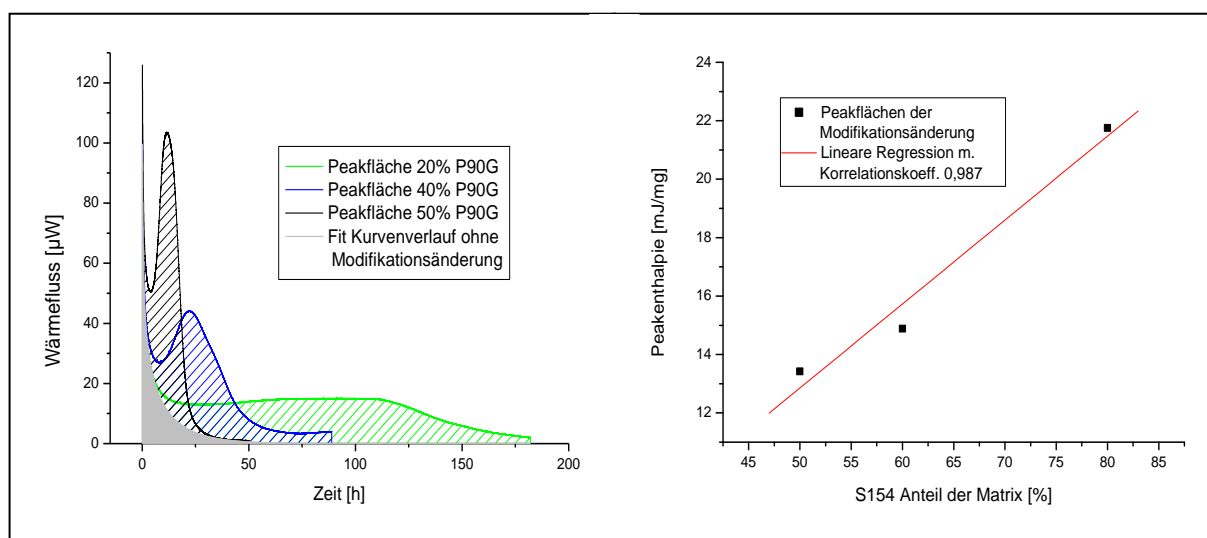


Abbildung 4.10: Vergleich der Rekristallisationswärmen mit dem Hartfettanteil der Lipidmatrices

Offensichtlich beschleunigt ein erhöhter P90G Gehalt in der Matrix alle Modifikationsänderungen (44). Auf die Kristallinität des Hartfettanteils scheint das P90G allerdings keinen Einfluss zu haben – die IMC-Peakintegrale der Modifikationsänderungen verhalten sich proportional zum S154-Gehalt der Matrix. Das P90G hat gewissermaßen eine katalytische Funktion auf die Strukturänderung des Hartfettes. Möglicherweise wird durch molekulare Wechselwirkungen von P90G mit S154 die



Aktivierungsenergie zur Modifikationsänderung herabgesetzt, ohne dass das Lecithin in die kristalline Struktur integriert wird.

#### 4.2.1.2 WAXD-Messungen [Schu]

Zur weiteren Interpretation der IMC-Messergebnisse wurden WAXD-Messungen an den Lipidmatrices nach bestimmten Lagerzeiten durchgeführt. Abbildung 4.11a zeigt die Diffraktogramme der unbehandelten Ausgangssubstanzen P90G und Softisan 154. Das Phospholipid zeigt einen Beugungsreflex bei  $2\theta = 7,5^\circ$ , was einem Netzebenenabstand von 1,2 nm entspricht. Das Hartfett (S154) zeigt insgesamt drei Reflexe bei  $2\theta = 23,4^\circ$ ,  $2\theta = 21,2^\circ$  und  $2\theta = 6,0^\circ$ . Dies entspricht Netzebenenabständen von 0,38 nm, 0,42 nm und 1,46 nm, die der metastabilen  $\beta'$ -Modifikation zugeordnet werden (112). In Abbildung 4.11b sind die Diffraktogramme der Lipidmatrices mit unterschiedlichem Gehalt an P90G dargestellt. Die Messungen wurden 24 h nach dem Aufschmelzen und Rekristallisieren der Proben durchgeführt.

*Tabelle 4.3: Übersicht der Röntgeninterferenzen und Netzebenenabstände der unterschiedlichen Hartfettmodifikationen (112)*

$\alpha$ -Modifikation	$21,41^\circ 2\theta$	0,415 nm
$\beta'$ -Modifikation	$23,41^\circ 2\theta$ , $21,16^\circ 2\theta$	0,38 nm, 0,42 nm
$\beta$ -Modifikation	$24,05^\circ 2\theta$ , $22,80^\circ 2\theta$ , $19,30^\circ 2\theta$	0,37 nm, 0,39 nm, 0,46 nm

Das reine S154 zeigt Reflexe bei  $2\theta = 5,5^\circ$  und  $2\theta = 21,6^\circ$  entsprechend den Gitterabständen von 1,6 nm und 0,41 nm. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die  $\alpha$ -Modifikation, die eine starke Interferenz bei 0,415 nm aufweist (45), (112). Die Matrix mit 10% P90G zeigt ein vergleichbares Diffraktogramm mit Reflexen bei  $2\theta = 5,4^\circ$  und  $2\theta = 21,5^\circ$  entsprechend 1,6 nm und 0,41 nm Gitterabstand. Bei weiter ansteigendem P90G Anteil von 30 und 50% sind bereits nach 1 Tag Lagerung Beugungsreflexe bei  $2\theta = 19,5^\circ$  (0,46 nm),  $2\theta = 21,3^\circ$  (0,42 nm) und  $2\theta = 23,4^\circ$  (0,38 nm) zu erkennen, die der  $\beta'$  und der  $\beta$ -Modifikation zuzuordnen sind. Nach 7 Tagen Lagerung (Abbildung 4.12a) zeigt auch die Matrix mit 10% P90G Änderungen im Diffraktogramm, die auf eine Veränderung zur  $\beta'$ - beziehungsweise  $\beta$ -Modifikation hindeuten. Bei dem System mit 50% P90G ist die Umwandlung in die  $\beta$ -Modifikation bereits nach 7 Tagen nahezu abgeschlossen. Im Diffraktogramm nach 4 Wochen

(Abbildung 4.12b) ist nur noch eine Intensitätsveränderung der Reflexe bei dem System mit 10% P90G zu verzeichnen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der IMC zeigen auch hier die Lecithin-Hartfett-Mischungen mit hohem P90G Anteil eine beschleunigte Änderung der Modifikation.

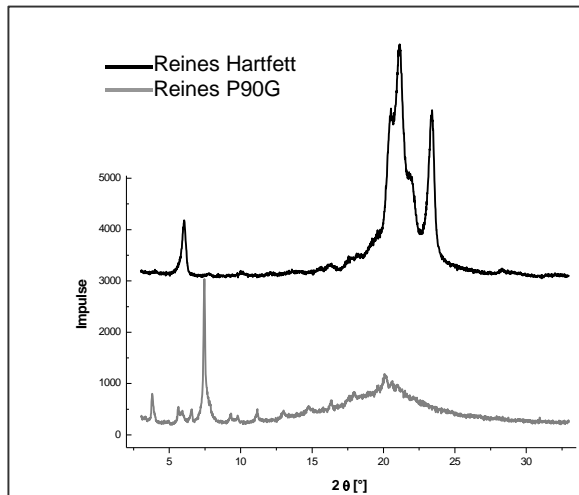


Abbildung 4.11a: Diffraktogramme der Reinsubstanzen (98)

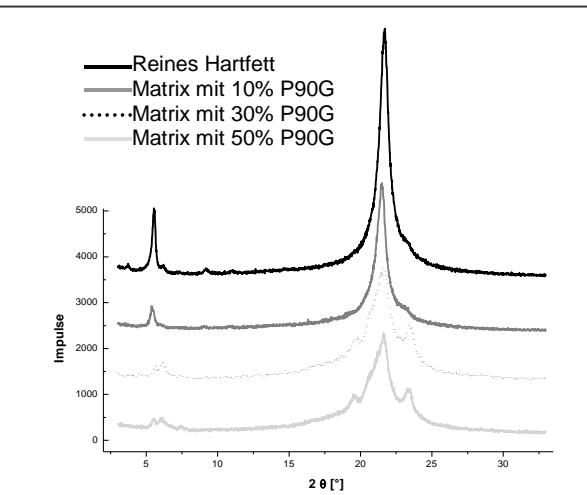


Abbildung 4.11b: Diffraktogramme der Lipidmatrixes 1 Tag nach der Rekristallisation (98)

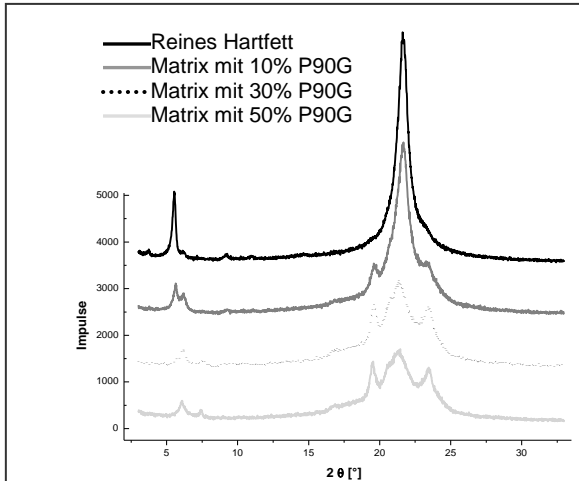


Abbildung 4.12a: Diffraktogramme der Lipidmatrixes 7 Tage nach der Rekristallisation (98)

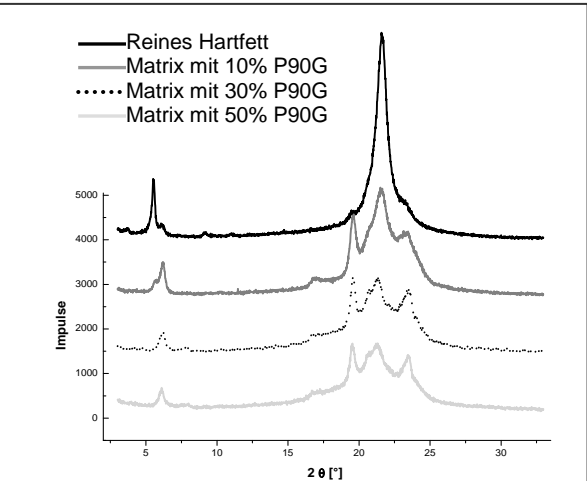


Abbildung 4.12b: Diffraktogramme der Lipidmatrixes 4 Wochen nach der Rekristallisation (98)

Nach einer Woche tritt bei den Systemen mit 50% und 30% P90G Gehalt in der Matrix der für das Phospholipon charakteristische Reflex bei  $2\theta = 7,5^\circ$  auf. Dies deutet darauf hin, dass sich ein Teil des P90G in geordneten Assoziaten zusammenlagert hat, deren Größe und Mengenanteil oberhalb der Nachweisgrenze liegt.

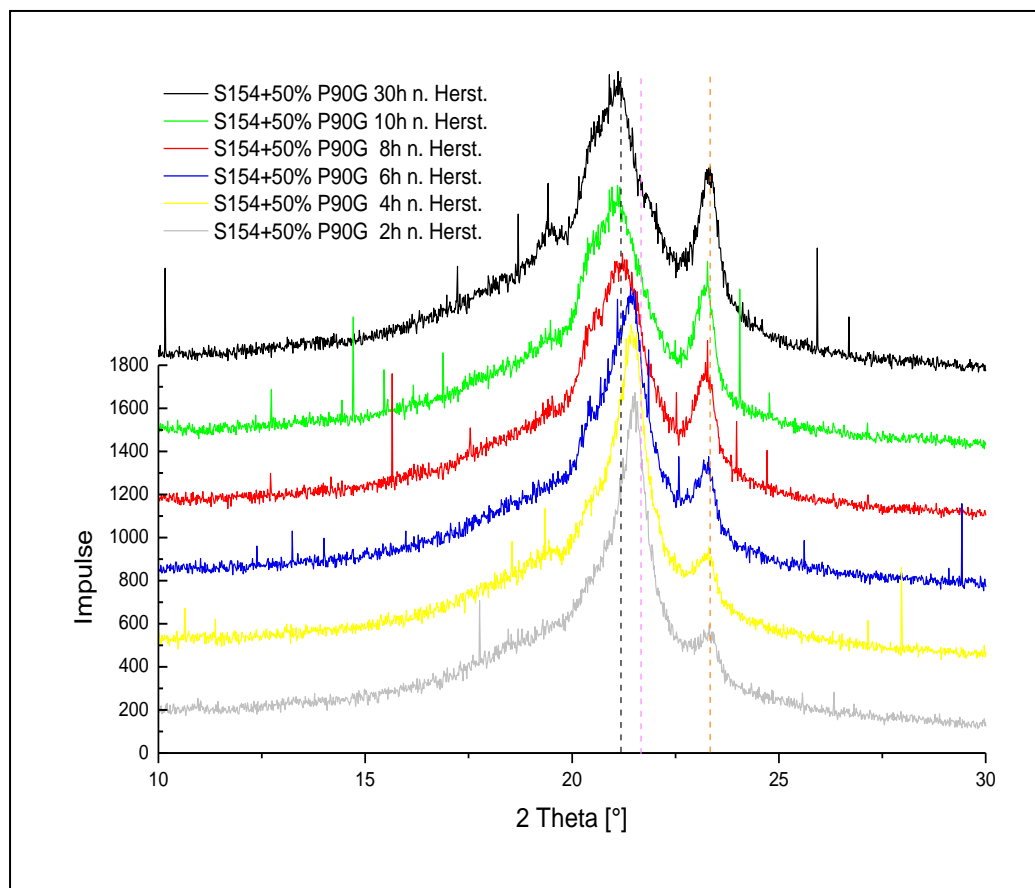


Abbildung 4.13: Röntgenweitwinkeldiffraktogramme der Lipidmatrix mit 50% P90G innerhalb der ersten 30 h nach Rekristallisation

Verfolgt man die Symmetrie der Beugungsreflexe, so stellt man fest, dass es während der Modifikationsänderungen zu einer Verbreiterung und zu einer Intensitätsabnahme der Signale gekommen ist (Abbildung 4.11b, 4.12a und 4.12b). Um den Verlauf der Modifikationsänderung direkt mit den IMC-Daten vergleichen zu können, wurden WAXD-Messungen in kurzen Abständen nach der Rekristallisation durchgeführt. Die Diffraktogramme des Systems mit 50% P90G (Abbildung 4.13) zeigen bereits kurz nach dem Abkühlen Beugungsreflexe, die auf eine sehr frühzeitige Modifikationsänderung hindeuten. Betrachtet man die Impulszunahme des Beugungsreflexes bei  $2\theta = 23,4^\circ$  (0,38 nm) innerhalb der ersten 30 h nach dem Abkühlen der geschmolzenen Matrix, so ist zu erkennen, dass die Fläche unter diesem Reflex, der der  $\beta'$ -Modifikation zuzuordnen ist, kontinuierlich zunimmt.

Vergleicht man (in Abbildung. 4.14) diese Flächenzunahme mit dem Integral des Rekristallisationspeaks des IMC-Thermogramms, zeigt sich zwar eine recht große Übereinstimmung des Kurvenverlaufs, allerdings tritt das Wärmesignal mit einer

Verzögerung von ca. 6 h gegenüber den Veränderungen der Beugungsreflexe auf. Ob der Wärmefluss tatsächlich so stark verzögert auftritt oder ob unterschiedliche apparative Messbedingungen für die zeitliche Differenz verantwortlich sind, konnte nicht geklärt werden. Das Kristallisationsverhalten kann zum Beispiel durch das Trägermaterial oder die Oberfläche beeinflusst werden – die Entstehung von Kristallisationskeimen kann durch Grenzflächen induziert werden (50).

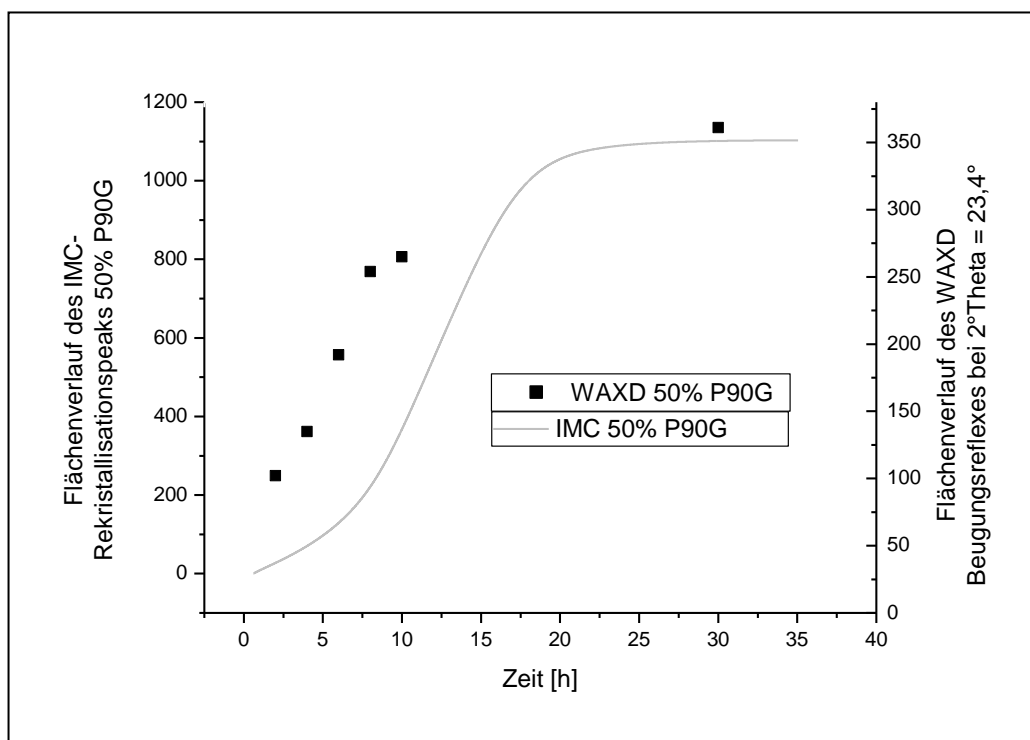


Abbildung 4.14: Gegenüberstellung der Veränderung des Integrals unter dem Beugungsreflex bei  $23,4^\circ$   $2\theta$  [Integrationseinheiten] mit der Wärmeabgabe [ $\mu\text{W}\cdot\text{h}$ ] bei der IMC während der Rekristallisation der 50% P90G-haltigen Lipidmatrix.

#### 4.2.1.3 DSC der Lipidmatrix

Die DSC wurde in Zusammenarbeit mit Schubert als weitere Methode eingesetzt, um den Verlauf der Rekristallisation und der Modifikationsänderungen während der Lagerung zu charakterisieren. Die Rekristallisation der geschmolzenen Lipidmatrix erfolgte, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der IMC und WAXD-Messungen, unbeeinflusst vom eingearbeiteten Lecithinanteil bei etwa  $43^\circ\text{C}$  (siehe Abbildung 4.17). Die Kristallinität der Lipidmatrix, beschrieben durch den Kristallinitätsindex (CI) (zur Berechnung siehe Abschnitt 3), wurde durch die Schmelzenthalpie der Probe bestimmt. Sie hängt, wie in Tabelle 4.4 zu sehen, ausschließlich linear vom

Hartfettanteil ab. Das eingearbeitete Phospholipon hat auch beim Aufschmelzen keinerlei Einfluss auf die Phasenübergangstemperatur der Matrix.

*Tabelle 4.4: Übersicht der aus den DSC-Thermogrammen ermittelten Phasenumwandlungsenthalpien der verschiedenen Lipidmatrices. Es wurden jeweils die Gesamtenthalpien der Erstarrungs- und Schmelzpeaks zugrundegelegt  $\pm$  Standardabweichung ( $n=3$ ) (98).*

Matrix	S154	10% P90G	20% P90G	30% P90G	40% P90G	50% P90G
<b>CI [%] Erstarrungs-enthalpie</b>	$-71,3 \pm 1,0$	$-65,8 \pm 2,4$	$-58,0 \pm 1,5$	$-51,1 \pm 2,0$	$-44,6 \pm 1,2$	$-37,4 \pm 1,9$
<b>CI [%] Schmelz-enthalpie nach 24 h</b>	$89,1 \pm 0,4$	$80,1 \pm 1,7$	$70,3 \pm 1,7$	$62,0 \pm 0,3$	$50,9 \pm 0,6$	$42,5 \pm 1,1$
<b>Differenzbetrag aus Erstarrungs und Schmelz-CI</b>	$17,8 \pm 0,6$	$14,3 \pm 1,7$	$12,3 \pm 1,3$	$10,9 \pm 1,2$	$6,3 \pm 0,8$	$5,1 \pm 1,3$
<b>Lineare Regression d. Erstarrungsenthalpie</b>		$Y = -0,68X - 3,97$		$(r^2 = 0,999)$		
<b>Lineare Regression d. Schmelzenthalpie</b>		$Y = 0,93X - 3,44$		$(r^2 = 0,999)$		

Betrachtet man die Erstarrungsenthalpien der unterschiedlichen Rezepturen, so zeigt sich, dass der Kristallinitätsindex um circa 13 – 30% gegenüber dem theoretisch<sup>2</sup> zu erwartenden Kristallinitätsindex gemindert ist. Diese Reduktion ist umso stärker, je geringer der P90G-Anteil in der Probe ist. Vergleicht man die Erstarrungsenthalpien mit den nach 24 h ermittelten Schmelzenthalpien der jeweiligen Systeme, so ist zu erkennen, dass die Lipidmatrices mit hohem P90G-Anteil bereits beim Auskristallisieren einen relativ hohen CI aufweisen. Da P90G allein im Thermogramm keine Schmelzenthalpie im betrachteten Temperaturbereich zeigt, ist auch hier davon auszugehen, dass durch das Lecithin eine Beschleunigung der Hartfettkristallisation induziert wird.

Innerhalb der ersten 48 h nach der Rekristallisation zeigen die DSC-Thermogramme der Matrices eine deutliche Veränderung. Abbildung 4.15 zeigt exemplarisch das Thermogramm der Lipidmatrix mit 30% P90G 15 Minuten nach der Rekristallisation. Es sind zwei voneinander getrennte Signale mit einer Peakminimumtemperatur von 48 °C (Peak A) und 57 °C (Peak B) zu erkennen. Peak A des Thermogramms ist laut Literatur (112) der  $\alpha$ -Modifikation zuzuordnen, Peak B könnte der  $\beta'$ -, der  $\beta_i$ - oder der  $\beta$ -Modifikation zugeordnet werden.

<sup>2</sup> Im Vergleich zur Kristallinität des reinen Bulk-Hartfetts.

Tabelle 4.5: Veränderung der Peakenthalpien im DSC-Thermogramm der Lipidmatrix mit 30% P90G innerhalb der ersten 48 h nach Beginn der Rekristallisation einer Schmelze (n=1)

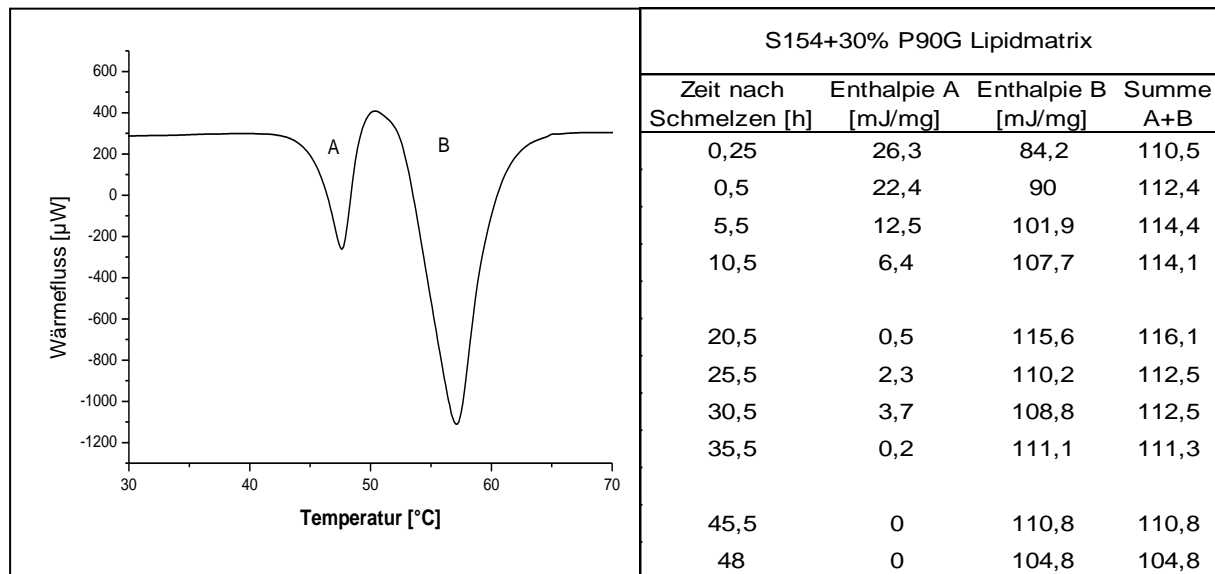


Abbildung 4.15: Schmelzpeaks im DSC-Thermogramm der unterschiedlichen Hartfettmodifikationen, 15 Min. nach dem Beginn der Rekristallisation einer Lipidmatrix mit 30% P90G (98).

Während der Lagerung kommt es, wie in Tabelle 4.5 gezeigt, zur Abnahme der Fläche von Peak A zugunsten von Peak B. Die gesamte Schmelzenthalpie bleibt von der Modifikationsänderung allerdings nahezu unbeeinflusst. Auch diese Umwandlung verläuft mit einem hohen Lecithinanteil der Matrix beschleunigt ab. Bei dem 30%igen System scheint, im Gegensatz zu den Ergebnissen der TAM- und WAXD-Messungen, die Modifikationsänderung im DSC-Thermogramm nach ca. 20 h abgeschlossen zu sein. Dieser Unterschied in der Umwandlungskinetik zwischen den einzelnen Methoden ist wahrscheinlich wie beim Vergleich zwischen TAM- und WAXD-Messungen auf unterschiedliche Messbedingungen zurückzuführen. Auch bei DSC-Untersuchungen der Matrices über einen Zeitraum von 4 Wochen konnten keine weiteren Veränderungen der Schmelzenthalpie oder der Peakminimumtemperatur nachgewiesen werden [Schu]. Die Empfindlichkeit der DSC reicht offenbar in diesem Fall nicht zur detaillierten Erfassung weiterer Modifikationsänderungen aus.

#### 4.2.2 Kristallisationsverhalten von SLN mit variierendem P90G-Gehalt

Im folgenden Abschnitt wird das Kristallisationsverhalten von SLN untersucht, die aus den zuvor beschriebenen Lipidmatrices durch Dispergieren in einer wässrigen

Außenphase hergestellt wurden. Wie in der Literatur (113) beschrieben, können die physikochemischen Eigenschaften der dispergierten Lipidphase stark von denen der Bulksubstanz differieren. Sind die Unterschiede – beispielsweise die Depression der Schmelztemperatur – nicht hinreichend bekannt, kommt es bei der Herstellung von SLN möglicherweise nicht zum gewünschten Ergebnis (114).

Die durch Hochdruckhomogenisation der geschmolzenen Lipidmatrix hergestellten SLN wurden ebenfalls mit IMC, WAXD und DSC untersucht. Zusätzlich wurden PCS-Messungen durchgeführt, um die Stabilität der Dispersion bezüglich ihrer Partikelgröße zu dokumentieren (115). Innerhalb von 4 Wochen kam es zu keiner Veränderung in der Partikelgrößenverteilung. Allerdings war bei einem Lecithinanteil von nur 10% in der Lipidmatrix die Produktion von SLN nicht reproduzierbar möglich, bei einigen Herstellungen entstanden Partikel im Größenbereich um 12 µm. Mit weniger als 10% P90G in der Lipidmatrix konnten bei einem Gesamtmatrixanteil von 15% keine SLN hergestellt werden. Eine Erhöhung des Lecithinanteils in der Matrix bis auf 30% führte zu einer Reduktion der Partikelgröße bis auf 100 nm. Höhere P90G-Konzentrationen bewirkten keine weitere Verringerung des Durchmessers.

#### **4.2.2.1 IMC-Messungen der SLN**

Wie bei der Untersuchung der Lipidmatrix, so konnten auch bei den SLN die IMC-Messungen erst nach 30 Minuten Equilibrierungszeit gestartet werden. Dadurch ist die Rekristallisation der Lipidmatrix bereits weit fortgeschritten. Abbildung 4.16 zeigt die Thermogramme der SLN mit unterschiedlichem P90G-Anteil der Lipidmatrix. Vergleicht man die Wärmeflusskurven der verschiedenen Systeme, so erkennt man, dass das System mit 50% P90G in der Lipidmatrix die steilste Abnahme der Wärmeflusskurve zeigt. Mit geringerem Lecithingehalt erfolgt das Absinken des Wärmeflusses kontinuierlich langsamer. Dies deutet darauf hin, dass, wie bereits bei den Bulk-Untersuchungen festgestellt, ein hoher P90G-Anteil die Auskristallisation des Hartfettes beschleunigt. Im Gegensatz zu den Bulk-Proben kommt es jedoch, auch nach mehreren Tagen, zu keinem Anstieg oder Abknicken der Wärmeflusskurve, was auf eine Modifikationsänderung des Hartfettes in den SLN hindeuten würde. Die Abfolge der Kurven ist zum einen durch die Geschwindigkeit der Rekristallisation bedingt, zum anderen zeigen natürlich die Systeme mit einem erhöhten S154-Gehalt einen stärkeren Wärmefluss, weil die Kristallisation hauptsächlich Hartfettmoleküle betrifft. Die Kristallisationskinetik lässt sich deshalb

am besten aus dem tangentialen Gefälle der Wärmeflusskurve in der Anfangsphase ableiten (vergl. Tabelle 4.6).

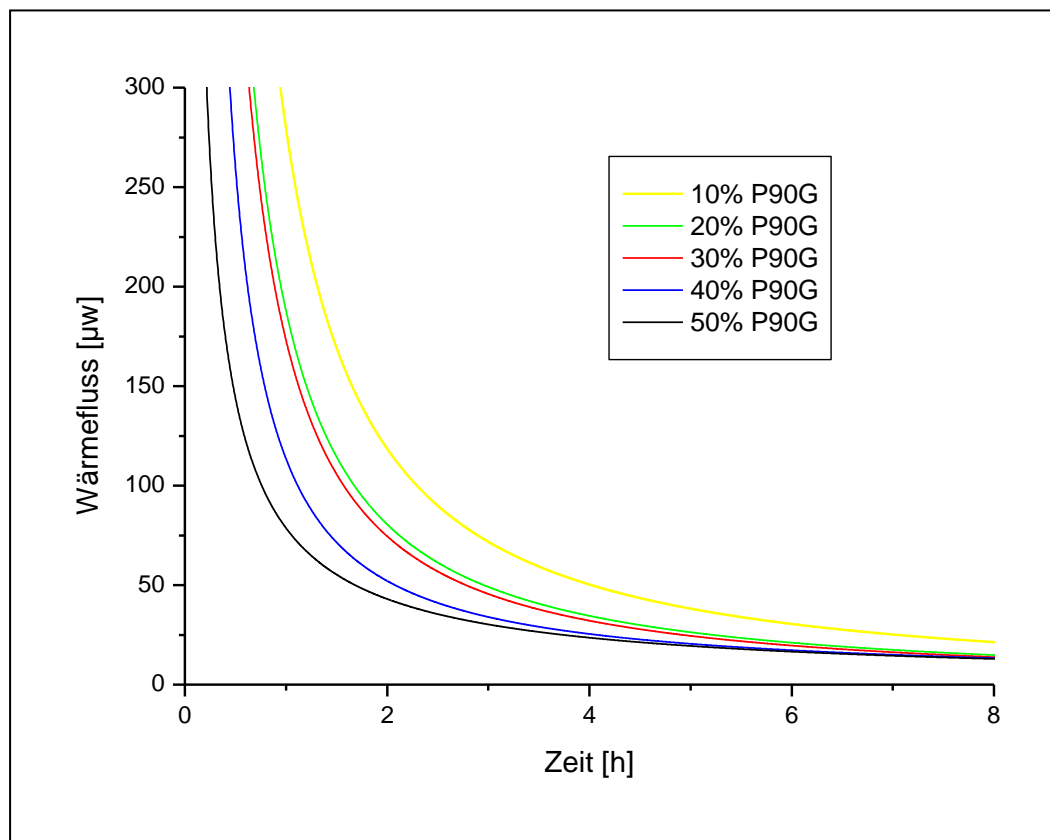


Abbildung 4.16: IMC-Thermogramme während der Rekristallisation der SLN, deren P90G-Anteil in der Matrix variiert wurde ( $n=4$ ), (98)

Tabelle 4.6: Gefälle der IMC-Wärmeflusskurven zu Beginn der Messung

Lecithinanteil der Matrix [%]	10%	20%	30%	40%	50%
Steigung der Wärmeflusskurve in den ersten 20 Minuten	-271,5	-365,3	-405,3	-577,2	-747,6

#### 4.2.2.2 WAXD der SLN mit unterschiedlichem P90G-Gehalt [Schu]

Die Röntgenweitwinkeluntersuchungen der SLN mit einer Debye-Scherrer-Kamera wurden 1 Tag nach Herstellung der Dispersionen durchgeführt. Die Interferenzen mit der größten Intensität entsprechen den typischen Netzebenenabständen (0,46; 0,39 und 0,37 nm) der stabilen  $\beta$ -Modifikation (45), (112). Zusätzlich sind noch weitere schwache Interferenzen zu erkennen, die allerdings keiner Modifikation zugeordnet



werden können (vergleiche Tabelle 4.7). Die Interferenzen werden durch eine Zunahme des Lecithinanteils in der Matrix kaum beeinflusst und bleiben über den Untersuchungszeitraum von 4 Wochen unverändert. Das Ergebnis korreliert mit den IMC-Thermogrammen, die eine Auskristallisation des Hartfettes ohne eine weitere Veränderung zeigen.

Tabelle 4.7: Übersicht der durch WAXD ermittelten Netzebenenabstände der SLN mit variierendem P90G-Anteil in der Lipidmatrix. Die unterschiedlichen Schriftschnitte kennzeichnen wie folgt die Intensität der Interferenzen: **stark**, mittel, schwach, (sehr schwach) ( $n=2$ ) (98)

SLN 10%	SLN 20%	SLN 30%	SLN 40%	SLN 50%
0,53	0,53	(0,53)	(0,53)	(0,53)
<b>0,46</b>	<b>0,46</b>	<b>0,46</b>	<b>0,46</b>	<b>0,46</b>
-	0,44	0,44	0,43	0,43
<b>0,39</b>	0,41-0,39	0,41-0,39	0,41-0,39	0,41-0,39
<b>0,37</b>	<b>0,37</b>	<b>0,37</b>	<b>0,37</b>	<b>0,37</b>

#### 4.2.2.3 DSC der SLN mit unterschiedlichem P90G-Gehalt

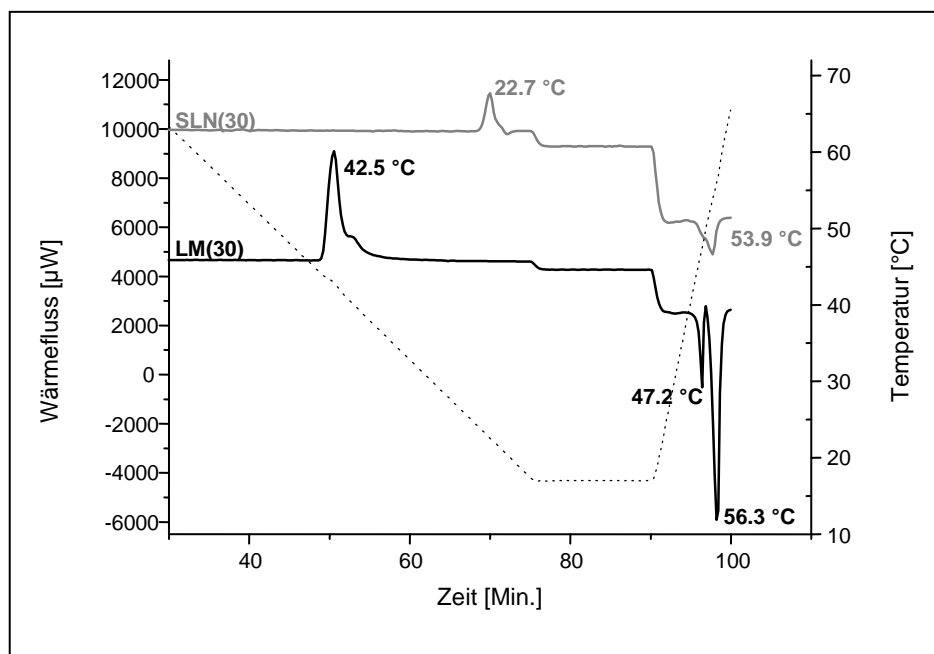


Abbildung 4.17: DSC-Thermogramm mit Erstarrungs- und Schmelzkurve von Lipidmatrix und SLN mit 30% P90G in der Lipidmatrix sowie zwischenzeitlicher 15-minütiger Behandlung bei 17 °C (Temperaturverlauf gestrichelt) (98).

Von den SLN Dispersionen wurden 2, 24, 48 und 72 Stunden sowie 1 und 4 Wochen nach Herstellung DSC-Thermogramme aufgenommen. Abbildung 4.17 zeigt beispielhaft die Erstarrungs- und Schmelzkurve von Lipidmatrix und SLN mit jeweils 30% P90G-Matrixanteil. Im Unterschied zum Thermogramm der Lipidmatrix zeigt das Thermogramm der SLN bereits unmittelbar nach dem Erstarren nur einen Schmelzpeak.

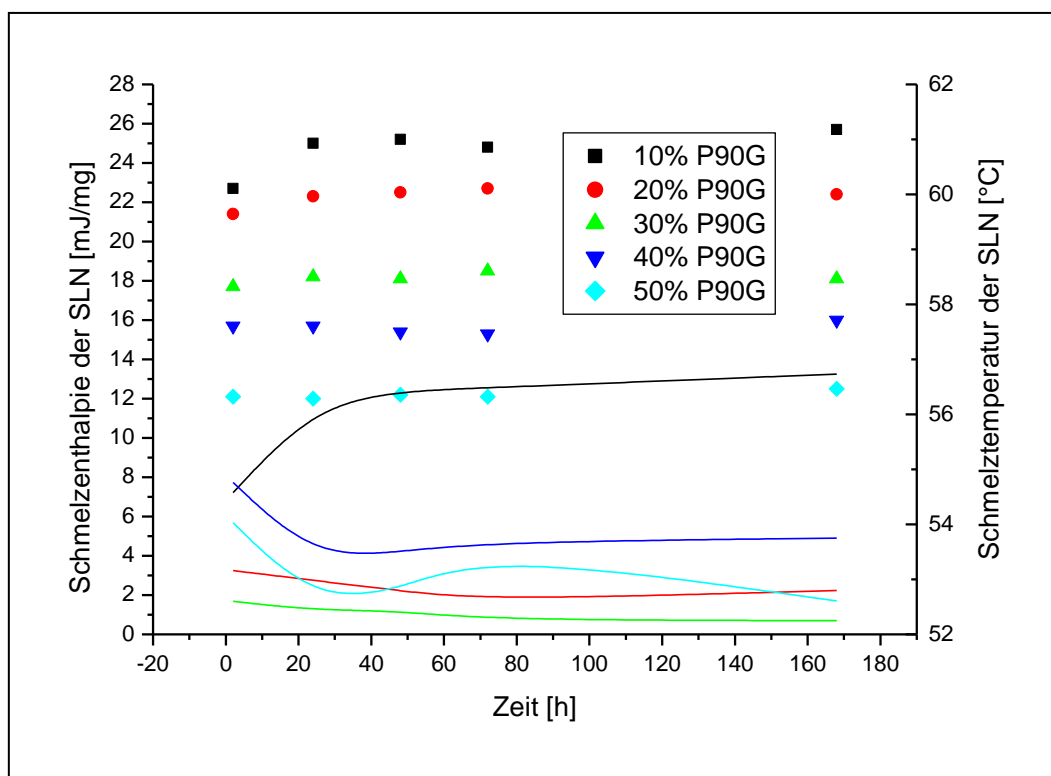


Abbildung 4.18: Aus DSC-Thermogrammen ermittelte Schmelztemperaturen (Linien) und –enthalpien (Symbole) der SLN mit variierendem P90G-Anteil in der Lipidmatrix ( $n=6$ ) bei zunehmender Lagerung nach der Herstellung.

Nur wenige Stunden nach Herstellung verändert sich die Schmelztemperatur der SLN mit 20 und 30% P90G in der Matrix praktisch nicht mehr und liegt bei etwa 53°C (SLN20) bzw. 52,5 °C (SLN30) (Abbildung 4.18). Eine konstante Schmelztemperatur ist bei der SLN-Zubereitung mit 40% P90G nach ca. 20 – 30 h festzustellen. Bei den Nanosuspensionen mit 50% sind nach dieser Zeitspanne leichte Schwankungen der Schmelztemperatur um 53 °C zu beobachten. Bei dem System mit 10% Lecithin liegt das Peakminimum nach 2h bei 54,4 °C und erreicht nach ca. 40 h konstante 56,5 °C (Abbildung 4.18). Durch den geringeren Lecithingehalt findet, wie im IMC-Thermogramm zu erkennen, die Kristallisation nur verzögert statt, so dass die Schmelztemperatur ihren endgültigen Wert nach 2 h noch nicht erreicht hat.

Außerdem hängt die Schmelztemperatur von der Partikelgröße der SLN ab. Mit nur 10% P90G entstehen deutlich größere SLN als mit höherem Lecithingehalt. Der Partikeldurchmesser durchläuft bei einem P90G-Anteil von 30% ein Minimum.

Vergleicht man die Schmelztemperaturen der SLN (Abbildung 4.18) eine Woche (168 h) nach Rekristallisation mit der Schmelztemperatur der Lipidmatrix (Abbildung 4.15 Peak B), so erkennt man, dass es durch die Dispersion der Matrix zu einer deutlichen Schmelzpunktdepression um ca. 4 – 7 °C kommt. Aufgrund ihrer geringen Partikelgröße besitzen die Dispersionen ein sehr großes Oberflächen / Volumen-Verhältnis. Dadurch befindet sich ein großer Anteil der Moleküle an der Oberfläche der Partikel in einem Zustand höherer Energie, so dass eine niedrigere Temperatur zum Schmelzen nötig ist.

Noch gravierender ist der Unterschied bei der Erstarrungstemperatur der dispergierten Lipidmatrix. Es kommt in dem dargestellten Beispiel (Abbildung 4.17) zu einer Depression um fast 20 °C. Daraus ist zu erkennen, dass nach der Herstellung der Dispersion unbedingt auf eine ausreichend kühle Lagerung zu achten ist.

Während die Peaksymmetrie des DSC-Schmelzpeaks vom Phospholipidanteil nahezu unbeeinflusst bleibt (ohne Abbildung), verändert sich die Schmelzenthalpie – wie auch bei der reinen Lipidmatrix beobachtet (vergleiche Tabelle 4.4) – linear mit dem S154 Anteil der Dispersion. Innerhalb des Untersuchungszeitraums von 4 Wochen traten ab 24 h nach Herstellung so gut wie keine Veränderungen der Schmelzenthalpien auf (Abbildung 4.18). Dies deutet ebenfalls auf eine unveränderte Kristallinität der Dispersionen hin.

Der aus den DSC-Schmelzenthalpien berechnete Kristallinitätsindex (CI) dient als Maß für die Kristallinität einer Substanz. Der CI der Dispersionen liegt etwas höher als der CI der entsprechenden Bulk-Matrix (vergl. Tabelle 4.8). Dies zeigt, dass die Kristallisation der SLN nicht nur schneller, sondern auch in etwas größerem Umfang verläuft. Allerdings wird die Differenz im CI zwischen SLN- und dazugehöriger Bulk-Matrix mit steigendem P90G-Gehalt immer geringer. Die Kristallisation der SLN verläuft nämlich bei allen P90G-Gehalten so schnell, dass eine durch die Erhöhung des P90G-Matrixanteils bedingte Beschleunigung nicht erfasst werden kann. Bei der Rekristallisation der Bulkmatrix, die von mehreren Modifikationsänderungen begleitet ist und erheblich länger andauert, hat der Lecithingehalt viel stärkere Auswirkungen auf die Kristallisationsgeschwindigkeit. Deshalb differiert bei geringem P90G-Anteil

der CI zwischen SLN und entsprechender Bulk-Matrix stärker als bei höherem Lecithinanteil.

*Tabelle 4.8: Vergleich der Kristallinitätsindizes ermittelt aus den DSC-Schmelzenthalpien 7 Tage nach Rekristallisation der Zubereitungen [n=3] (98)*

Lecithinanteil der Matrix [%]	10%	20%	30%	40%	50%
CI Lipidmatrix	80,3 ± 0,6	70,2 ± 1,0	61,6 ± 1,1	51,6 ± 0,2	42,1 ± 2,0
CI SLN-Dispersion	95,2 ± 4,5	83,2 ± 2,1	67,0 ± 1,0	60,0 ± 2,2	45,5 ± 1,4

#### 4.2.2.4 Kristallisationsmechanismen und Kristallisationskinetik

Durch Integration der IMC-Wärmeflusskurve erhält man die freigesetzte Kristallisationswärme ( $\Delta H_{IMC}$ ). Setzt man diese ins Verhältnis ( $R_{\Delta H}$ ) zu der durch DSC ermittelten Schmelzenthalpie des reinen gelagerten Hartfettes ( $\Delta H_{Theor.}$ ) von 179,3 mJ/mg (Gleichung 4.3),

$$R_{\Delta H} = \frac{\Delta H_{IMC}}{\Delta H_{Theor.}}$$

*Gleichung 4.3*

so zeigt sich, dass bei allen Nanosuspensionen trotz unterschiedlicher Wärmeflusskurven (vergl. Abbildung 4.16) nur etwa 20% von  $\Delta H_{Theor.}$  erfasst werden (siehe Tabelle 4.9  $R_{\Delta H} \approx 0,2$ ). Dies ist auf die 30 minütige Equilibrierungszeit zurückzuführen, in der ein Großteil der Kristallisation bereits stattgefunden hat. Diese Betrachtung setzt eine Übereinstimmung zwischen Erstarrungsenthalpie und Schmelzenthalpie voraus. Davon ist bei den SLN-Dispersionen auszugehen, weil nichts mehr auf eine nachträgliche Modifikationsänderung hindeutet.

Der Verlauf der IMC-Wärmeflusskurve reicht aus, um die Kristallisationsparameter nach Avrami zu ermitteln. Das Geschwindigkeitsprofil wird, wie eingangs beschrieben, durch die Parameter k und n charakterisiert. Der Avrami-Parameter k ist die Geschwindigkeitskonstante, mit der eine isothermale Phasenumwandlung abläuft. Der Avrami-Exponent n ist abhängig vom Mechanismus der Kristallkeimbildung und beschreibt den Wachstumsmechanismus der Kristalle, insbesondere die Raumrichtungen, in die eine Ausdehnung des Kristalls erfolgt.

Tabelle 4.9: Kristallisationsparameter nach Avrami, ermittelt aus den IMC-Thermogrammen der SLN-Rekristallisation (98).

System	$R_{\Delta H}$	n	k [min <sup>-1</sup> ]
SLN 10% P90G	0,20	0,59	1,53
SLN 20% P90G	0,20	0,51	2,19
SLN 30% P90G	0,21	0,53	2,03
SLN 40% P90G	0,21	0,45	2,96
SLN 50% P90G	0,22	0,42	3,63

Vergleicht man die Avrami-Parameter der unterschiedlichen SLN, so erkennt man eine Veränderung der Kristallisationsmechanismen in Abhängigkeit vom P90G-Gehalt. Mit steigendem Lecithingehalt nimmt der Wert für n von 0,59 auf 0,42 ab. Dies deutet auf eine Verringerung der Ausdehnungsrichtungen hin. Allgemein gilt ein Wert von 0,5 für ein gesättigtes, diffusionskontrolliertes, eindimensionales Kristallwachstum (53), (116). Für die Kristallisation von getrocknetem MilCHFett ist nachgewiesen, dass hohe Phospholipidkonzentrationen das Kristallwachstum behindern können, indem sich die Phospholipide an den Wachstumspunkten der Kristalle anlagern (117). Dies könnte auch für die untersuchten Dispersionen zutreffen. Insgesamt wird allerdings die Kristallisation durch eine Zunahme des Parameters k bei steigendem Lecithingehalt wieder ausgeglichen. Letztendlich findet das Kristallwachstum zwar in weniger Raumrichtungen, dafür aber mit höherer Geschwindigkeit statt, so dass für alle Systeme eine nahezu gleiche Kristallisation resultiert.

#### 4.2.3 Untersuchung der Nanosuspensionen mit variierender Emulgatorkonzentration

Im untersuchten System ist zusätzlich zum Lecithin der Einsatz eines weiteren Emulgators für die Herstellung stabiler SLN notwendig. Im Folgenden wurde der Einfluss des nichtionischen Emulgators Solutol HS15 (HS15) auf das Kristallisationsverhalten der SLN untersucht. Hierzu wurde bei konstanter Zusammensetzung der Lipidmatrix mit 30% Phospholiponanteil die Konzentration an HS 15 zwischen 1,5% und 7,5% variiert (vergleiche 3.2.1.9.2).

#### 4.2.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Tabelle 4.10: Durch PCS ermittelte Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung der SLN mit 30% P90G-Anteil in der Lipidmatrix und variierender Emulgatorkonzentration HS15 [ $n=3$ ] (98).

Solutolanteil [%]	1 Tag		7 Tage		28 Tage	
	Größe [nm]	PI	Größe [nm]	PI	Größe [nm]	PI
<b>1,5</b>	325 ± 13	0,28 ± 0,02	317 ± 6	0,22 ± 0,01	300 ± 14	0,25 ± 0,03
<b>3,0</b>	100 ± 1	0,19 ± 0,02	95 ± 4	0,17 ± 0,02	103 ± 2	0,22 ± 0,01
<b>7,5</b>	61 ± 1	0,17 ± 0,02	64 ± 3	0,15 ± 0,03	69 ± 3	0,21 ± 0,04

Wie in Tabelle 4.10 dargestellt, wirkt sich die Veränderung der Emulgatorkonzentration direkt auf die Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung – ausgedrückt durch den Polydispersitätsindex (PI) – aus. Durch einen erhöhten HS15 Gehalt kann eine größere Grenzfläche der Dispersion mit Emulgatormolekülen stabilisiert werden, beziehungsweise steigt die Emulgatorkonzentration in der Grenzfläche an. Als Konsequenz nehmen die Partikelgröße und der Polydispersitätsindex mit steigender HS15-Konzentration ab. Für das jeweilige System bleiben die Werte über den Untersuchungszeitraum von 4 Wochen nahezu konstant.

#### 4.2.3.2 IMC der SLN mit variierender Emulgatorkonzentration

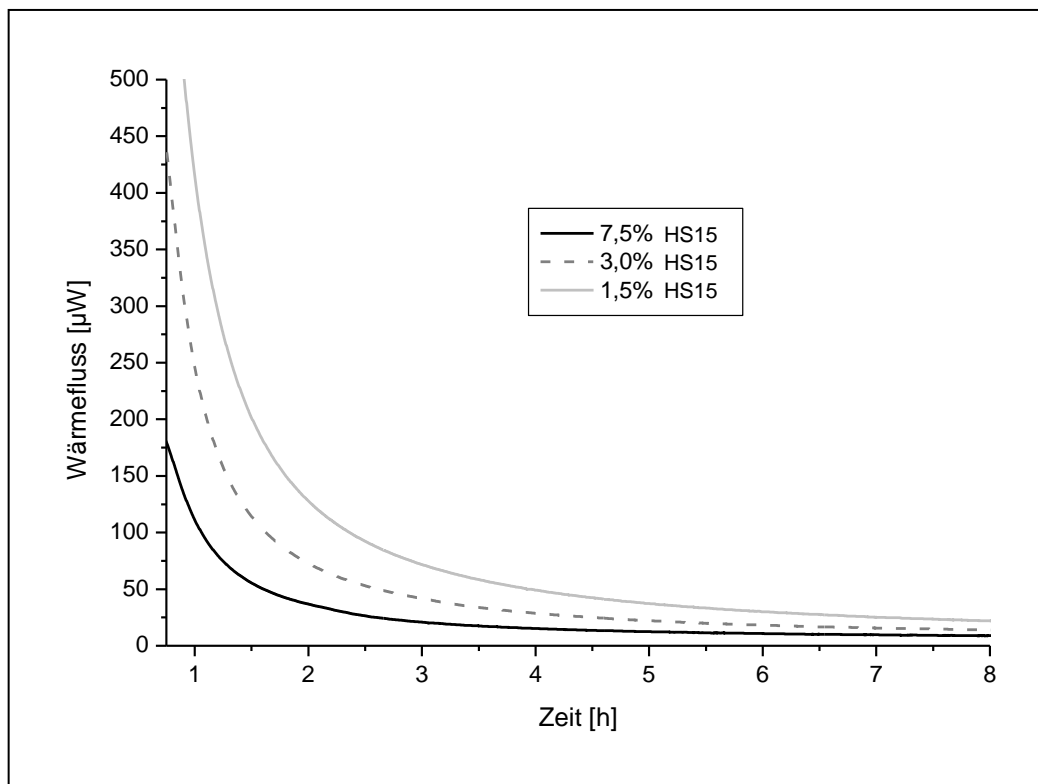


Abbildung 4.19: IMC-Thermogramme der SLN mit 30% P90G in der Lipidmatrix und variierender Emulgatorkonzentration HS15 (98).

Im Thermogramm (Abbildung 4.19) sind die Wärmeflusskurven der SLN-Dispersionen mit 1,5%, 3,0% und 7,5% HS15-Gehalt abgebildet. Alle drei Formulierungen zeigen ein kontinuierlich abfallendes Wärmesignal, das auf eine Kristallisation ohne Modifikationsänderung hindeutet. Mit zunehmendem Emulgatoranteil ist – zumindest im Messzeitraum – die anfallende Wärmemenge insgesamt geringer. Außerdem ist ein frühzeitiges Abklingen des Wärmeflusses zu erkennen. Diese Kurvenabfolge kann zwei Ursachen haben. Zum einen könnte die Kristallisation bei Dispersionen geringer Partikelgröße möglicherweise beschleunigt ablaufen, so dass die Hauptphase der Kristallisation aufgrund der Equilibrierungszeit nicht erfasst wird. Zum anderen kann die Kristallisation bei sehr kleinen Partikeln eher unterdrückt sein, was ebenfalls ein reduziertes Wärmeflussignal zur Folge hätte. In beiden Fällen würde daraus eine Abnahme des tangentialen Gefälles der Wärmeflusskurven resultieren. Zieht man zur Interpretation die Schmelzenthalpien der DSC-Messungen heran, ist zwar eine Abnahme des CI bei steigendem HS15-Anteil zu beobachten (vergl. 4.2.3.3). Diese kann allerdings nicht allein für den unterschiedlichen Verlauf

der Wärmeflusskurven verantwortlich sein. Berechnet man den während der IMC-Messung kristallisierenden Anteil  $R_{\Delta H}$ , zeigt sich, dass von dem System mit 1,5% HS15-Anteil 40% der theoretisch zu erwartenden Wärmemenge erfasst werden, beim System mit 7,5% sind es hingegen nur noch 11%. Auch beim Kristallisationsparameter  $k$ , der die Geschwindigkeit der Kristallisation ausdrückt, ist eine Zunahme bei erhöhter HS15-Konzentration zu beobachten (vergl. Tabelle 4.12). Dementsprechend scheint die Kristallisation sowohl beschleunigt, als auch in einem geringeren Ausmaß abzulaufen.

*Tabelle 4.12: Tangentiale Steigung im Anfangsbereich der IMC Wärmeflusskurven, kristallisierender Anteil  $R_{\Delta H}$  und aus den IMC-Thermogrammen der SLN-Rekristallisation mit variierendem Emulgatorgehalt nach Avrami ermittelte Kristallisationsparameter.*

Emulgatorgehalt HS15	Anfangssteigung	$R_{\Delta H}$	$n$	$k$ [ $\text{min}^{-1}$ ]
1,5%	-1324	0,40	0,63	0,89
3,0%	-859	0,24	0,49	2,00
7,5%	-305	0,11	0,37	7,57

#### 4.2.3.3 DSC der SLN mit variierender Emulgatorkonzentration

Die DSC-Thermogramme (Abbildung 4.20) der jeweiligen Rezeptur zeigen über den Untersuchungszeitraum von 4 Wochen eine nahezu unveränderte Schmelzkurve. Allerdings unterscheidet sich der Kurvenverlauf der einzelnen Rezepturen deutlich voneinander. Systeme mit einem Emulgatoranteil von 1,5% haben im Thermogramm ihr Peakminimum bei 57 °C. Mit steigendem HS15 Gehalt nimmt die Peakminimumtemperatur ab. Dies ist, wie bereits beschrieben, hauptsächlich durch eine verringerte Partikelgröße und ein damit verbundenes größeres Oberflächen- / Volumenverhältnis zu erklären. Betrachtet man allerdings die Form der Schmelzpeaks, so zeigt sich bei einer Erhöhung des Emulgatoranteils eine deutliche Verbreiterung des Schmelzsignals. Dies lässt auf eine geringere Ordnung des kristallisierten Materials schließen. Darüber hinaus ist die Schmelzenthalpie bei höherem Emulgatorgehalt reduziert. Auch hierfür kann der Grund das große Oberflächen- / Volumenverhältnis sein. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Kristallinität generell durch den Einfluss von HS15 reduziert ist. Der letztgenannte Aspekt würde auch mit den IMC-Wärmeflusskurven übereinstimmen. Es ist daher



wahrscheinlich, dass die Kristallinität durch eine erhöhte Emulgatorkonzentration vermindert wird. Ob die verminderte Partikelgröße oder das HS15 selbst dafür verantwortlich ist, kann nicht geklärt werden.

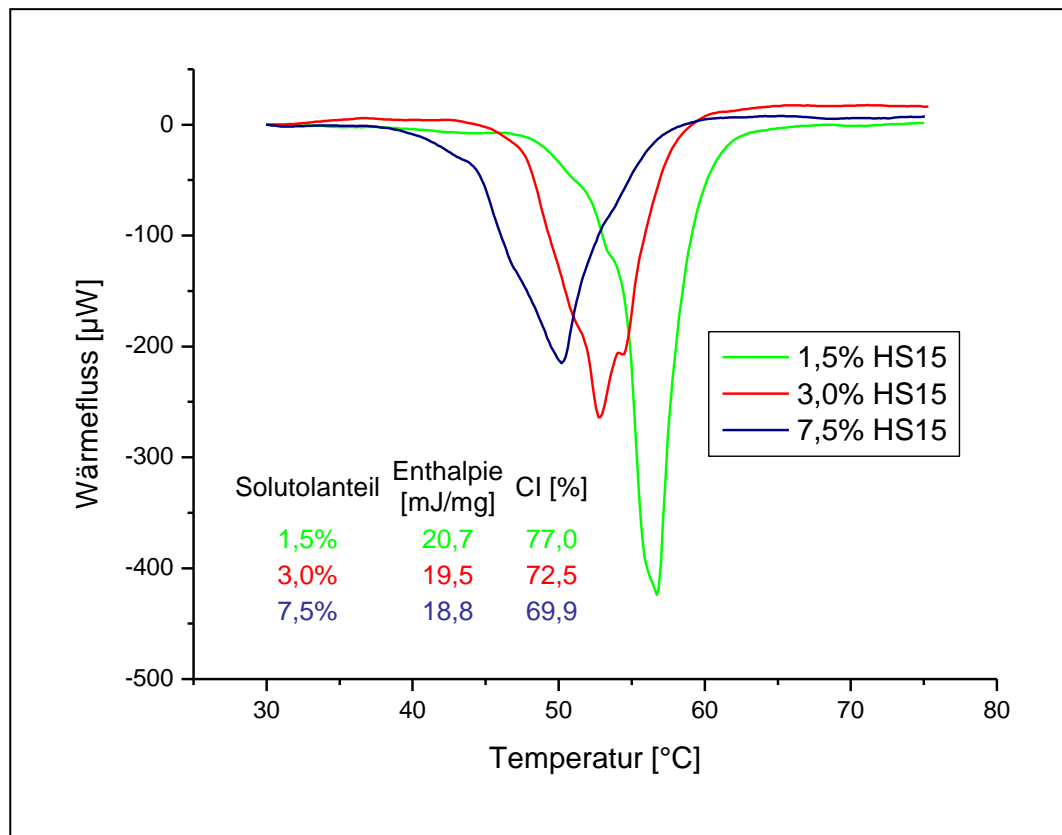


Abbildung 4.20: Schmelzpeaks aus den DSC-Thermogrammen der SLN mit variierendem Emulgatoranteil HS15 nach 7 Tagen Lagerung

#### 4.2.3.4 WAXD der SLN mit variierender Emulgatorkonzentration

Die Ergebnisse der Röntgenweitwinkeluntersuchungen [Schu] zeigen, dass alle Formulierungen unabhängig vom HS15 Anteil direkt nach der Herstellung in der stabilen  $\beta$ -Modifikation vorliegen (vergl. Tabelle 4.7). Dies stimmt mit den IMC-Messergebnissen überein, die ebenfalls keine nachträgliche Modifikationsänderung im Messzeitraum erkennen lassen. Ein genauer Intensitätsvergleich der Beugungsringe zur Beurteilung der Kristallinität war leider nicht möglich, so dass die Röntgendaten keine quantitativen Aussagen zur Kristallinität der unterschiedlichen Rezepturen ermöglichen.

#### **4.2.4 Rekristallisationsuntersuchungen von Lipidmatrices und SLN, hergestellt aus gesättigten Sojalecithinen**

Lecithine mit vollständig hydrierten und damit linearen Fettsäureketten zeigen eine größere strukturelle Übereinstimmung mit dem verwendeten Matrixlipid (Softisan 154) als Lecithine mit ungesättigten Fettsäuren. Sie können deshalb besser in das Kristallgitter des Hartfettes integriert werden. In den folgenden Untersuchungen wurde das Phospholipon 90G gegen das aus vollständig hydrierten Fettsäuren zusammengesetzte Phospholipon 90H (P90H) ausgetauscht. Darüber hinaus wurden keine weiteren Veränderungen an der Rezeptur und am Herstellungsverfahren vorgenommen. Bis zu 50% (m/m) P90H konnten homogen in die Lipidmatrix eingearbeitet werden. Die folgenden IMC-Untersuchungen wurden in Ergänzung des Promotionsvorhabens von Riem Hussein (118) durchgeführt.

##### **4.2.4.1 IMC-Untersuchungen der Lipidmatrix**

Abbildung 4.21 zeigt die Thermogramme der Lipidmatrices mit unterschiedlichem P90H-Anteil. Bei allen Formulierungen ist ein kontinuierlich abfallendes Wärmesignal zu beobachten, das auf eine Kristallisation ohne anschließende Modifikationsänderung hindeutet. Die Wärmeflusskurven der verschiedenen P90H-Matrices zeigen einen nahezu deckungsgleichen Verlauf. Daraus ist zu schließen, dass das Kristallisationsverhalten vom P90H-Anteil vollkommen unabhängig ist. Eigentlich wäre eine Differenz der einzelnen Thermogramme aufgrund der unterschiedlichen Hartfettmengen zu erwarten gewesen. Da dies nicht der Fall ist, ist davon auszugehen, dass das P90H aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu den ungesättigten Fettsäuren sehr gut in die kristalline Struktur der Lipidmatrix integriert wird. Diese Vermutung wird auch dadurch unterstützt, dass keine Modifikationsänderungen innerhalb der ersten 70 Stunden der Rekristallisation zu beobachten sind. Weiterführende Untersuchungen von R. Hussein haben gezeigt, dass P90H und S154 zur Mischkristallbildung in der Lage sind (118), wobei zunächst eine  $\alpha$ -Modifikation der Lipide (s. Abbildung 4.21) nachzuweisen ist.

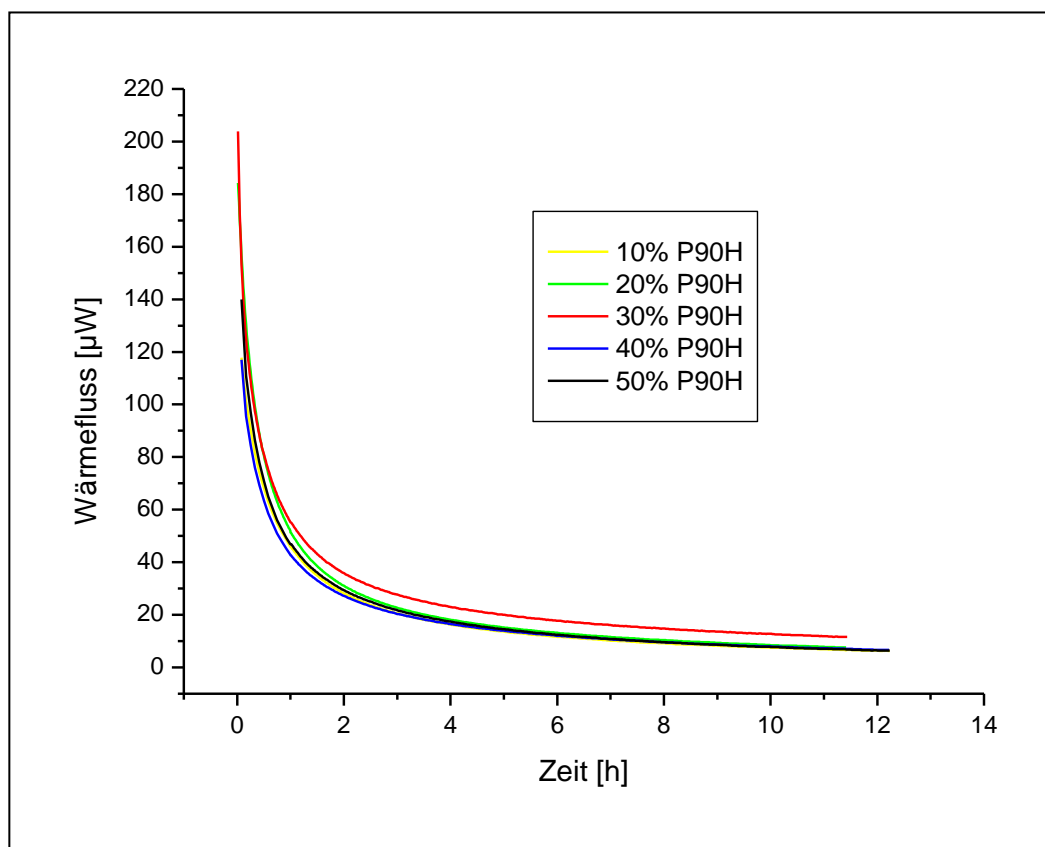


Abbildung 4.21: IMC-Thermogramme der Lipidmatrices mit variierendem P90H-Anteil (118).

#### 4.2.4.1 IMC-Untersuchungen der SLN

Nanopartikeldispersionen mit einem Matrixanteil von 15% ließen sich nur mit Lipidmatrices geringer Phospholipidkonzentrationen bis 20% reproduzierbar herstellen. Bei höherem Lecithinanteil kam es bereits während der Herstellung in einigen Fällen zum Verstopfen des Hochdruckhomogenisators. In Abbildung 4.22 sind die Thermogramme der SLN 30 Minuten nach Herstellung dargestellt.

Die Kurven zeigen innerhalb von 8 Stunden eine kontinuierliche Abnahme des Wärmeflusses, was auf eine Kristallisation ohne Modifikationsänderung hindeutet. WAXD- und Stabilitätsuntersuchungen von R. Hussein (118) belegen, dass bereits während des Auskristallisierens die stabile  $\beta$ -Modifikation entsteht. Der Wärmefluss der Rezeptur mit geringerem Phospholipongehalt ist gegenüber dem Wärmefluss der Rezeptur mit höherem P90H-Anteil erhöht. Auch zeigt die Formulierung mit 20% P90H ein steiler abfallendes Wärmesignal. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Messergebnissen der P90G-haltigen Nanopartikel. Ein erhöhter S154-Anteil führt auch hier zu einem stärkeren Wärmefluss und das P90H scheint ebenfalls die Kristallisation der dispergierten Lipidmatrix zu beschleunigen.

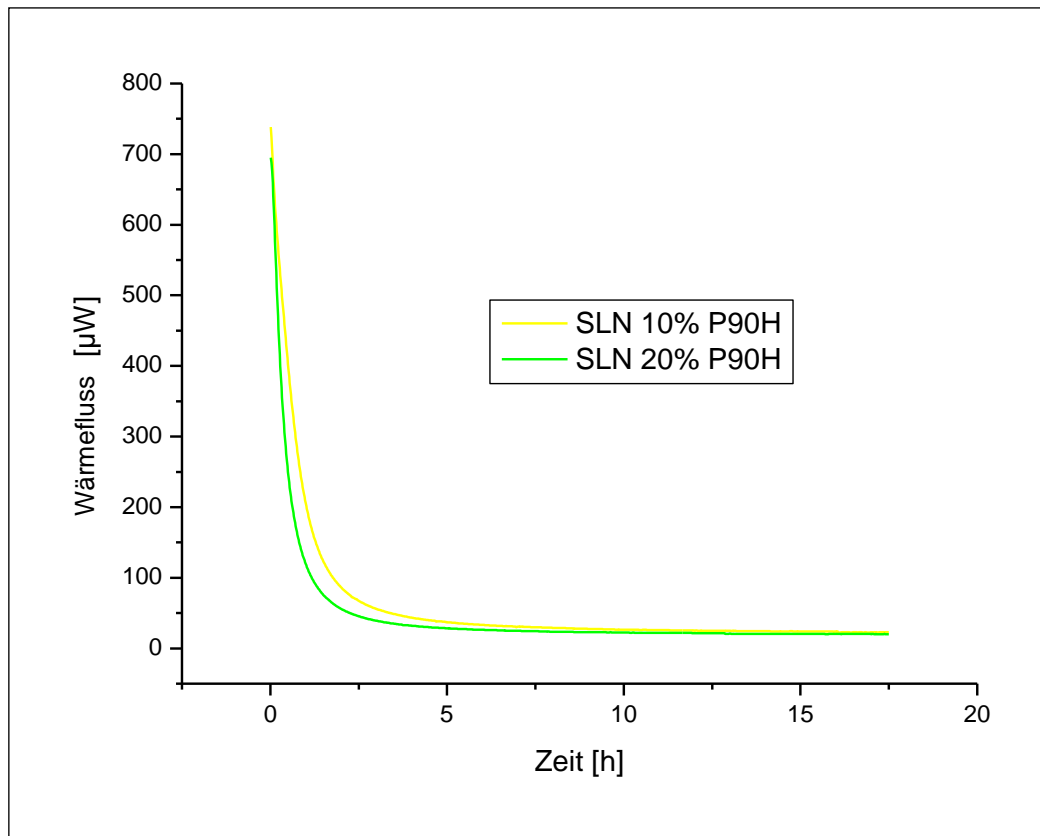


Abbildung 4.22: IMC-Thermogramme der SLN mit variierendem P90H-Anteil in der Lipidmatrix (118)

### 4.3 Beladung kolloidaler Arzneistoffträger mit Proteinen

In den folgenden Untersuchungen werden die in den vorherigen Abschnitten charakterisierten SLN mit Bovinem Serum Albumin (BSA) als Modelprotein beladen. Der Hintergrund für diese Untersuchung ist eine potentielle Anwendung dieses Arzneistoffträgers als Adjuvans. Bei einer Impfprophylaxe mit Protein-Antigenen, soll durch die SLN nach parenteraler (i.m.) Applikation die Immunantwort intensiviert werden. Wie bereits eingangs erwähnt, ist bei vielen Proteinen aufgrund ihrer thermischen und mechanischen Empfindlichkeit eine Beladung der SLN nur durch Adsorption möglich. Eine Methode zur indirekten Quantifizierung der BSA-Adsorption an die SLN besteht in der Bestimmung der nicht adsorbierten BSA-Menge, wie von Schubert durchgeführt (115). Hierzu wird nach 24 h Inkubationszeit das nichtadsorbierte BSA mit Bradford-Reagenz umgesetzt und UV-spektroskopisch vermessen. Eine direkte Erfassung von Adsorptionsvorgängen ist sehr schwierig, oft können nur Strukturveränderungen eines Proteins als Folge eines Adsorptionsvorgangs, beispielsweise mit dem Circular dichroismus (CD),

Ramanspektroskopie oder mittels Kernmagnetischer Resonanzspektroskopie, erfasst werden. Diese Methoden bieten allerdings in der Regel keine Möglichkeit der in situ Überwachung einer Probe. Im Folgenden soll geprüft werden, ob die IMC zur Detektion und direkten Überwachung von Adsorptionsvorgängen an SLN geeignet ist.

#### **4.3.1 Adsorption von BSA an SLN**

##### **4.3.1.1 IMC-Messungen der Proteinadsorption**

Zur Untersuchung der Proteinadsorption an SLN wurde eine BSA-Lösung (10% m/V) verwendet, die in einzelnen Schritten von 12,88 µl zu einer 2 Wochen zuvor hergestellten Nanopartikeldispersion titriert wurde. Sowohl die SLN- als auch die BSA-Lösung zeigten allein vermessen im IMC-Thermogramm keinen Wärmefluss. Abbildung 4.23 zeigt exemplarisch das Titrations-Thermogramm und die Peakenthalpien einer SLN-Dispersion (Matrixgehalt 15%, P90G-Anteil in der Matrix 20%, HS15-Gehalt 3%). Das Titrationsvolumen ist bis auf die letzte Zugabe in jedem Schritt konstant. Mit voranschreitender BSA-Zugabe nimmt die Peakenthalpie kontinuierlich ab, geht jedoch auch bei weiteren Anschlusstitrationsen nie ganz auf Null zurück. Nach beendeter Titration weist das beladene System Basislinienstabilität auf. Die Peakintensitäten der ersten beiden Titrationspeaks weisen bei nahezu allen Systemen eine sehr schlechte Reproduzierbarkeit auf<sup>3</sup>. Eine Ursache hierfür könnte eine relativ starke Verdünnungsenthalpie am Anfang der Titration sein, weil es auch bei Titration der 10%igen BSA-Lösung in bidestilliertes Wasser bei den ersten Titrationssignalen zu relativ starken Schwankungen kommt (ohne Abbildung). Ab dem dritten Titrationsschritt macht die Verdünnungsenthalpie nur noch etwa 10% der Peakenthalpien der titrierten SLN-Dispersionen aus. Aus diesem Grund bleiben für die weiteren Betrachtungen die Peakenthalpien der ersten beiden Titrationsschritte unberücksichtigt.

---

<sup>3</sup> Bei unterschiedlichen Chargen des Systems mit 20% P90G in der Matrix trat eine relative Standardabweichung von 64% auf (n=3).

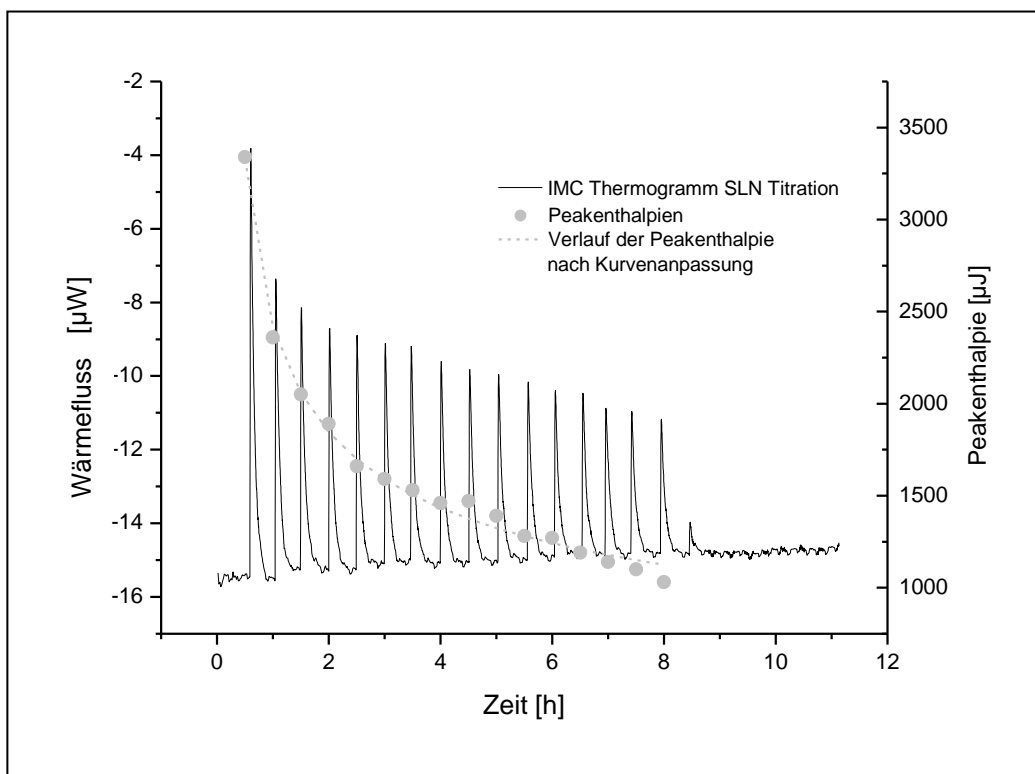


Abbildung 4.23: IMC-Thermogramm der Titration einer SLN-Dispersion (20% P90G-Anteil in der Matrix, bei einem Gesamtmatrixgehalt von 15%) mit einer 10%igen (m/V) BSA-Lösung

Anhand der Thermogramm-Peaks ist eindeutig eine exotherme Wechselwirkung zwischen dem BSA und den SLN zu erkennen. Da eine spontan ablaufende Adsorption von BSA an die eingesetzten SLN nachgewiesen werden konnte (115), ist zumindest ein Teil des gemessenen Wärmeflusses der Proteinadsorption zuzuordnen. Bei der Annäherung des Proteins an die Partikeloberfläche kommt es, hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen, wie beispielsweise Van-der-Waals-Kräfte, aber auch durch elektrostatische Wechselwirkungen, zur Anlagerung.

Trotz der Anreicherung von Phospholipiden und HS15 in der Grenzfläche der unbeladenen SLN (119), ist davon auszugehen, dass auf der Oberfläche der Partikel, insbesondere bei geringem Phospholipidgehalt der Matrix, einige hydrophobe Bereiche vorhanden sind. Diese bewirken in wässriger Lösung eine entropisch unvorteilhafte Anordnung von Wassermolekülen. Durch Adsorption des BSA an die SLN kann eine teilweise Abschirmung dieser hydrophoben Bereiche und eine damit verbundene günstigere Entropie des Systems erreicht werden. Dieser Vorgang ist bei der IMC als exothermes Wärmesignal zu erkennen (120). Darüber hinaus kann

es beim BSA zu einer Konformationsänderung kommen, die ebenfalls an dem Wärmesignal beteiligt sein kann. BSA ist den sogenannten „soft proteins“ zuzuordnen (121). Diese Proteine weisen eine geringere Strukturstabilität als die „hard proteins“ auf, zu denen beispielsweise Lysozym zählt. Allerdings sind die Adsorptionseigenschaften der strukturell labilen Proteine besser, weil sie mit dem Trägermolekül besser in Wechselwirkung treten können (121). Das Ausmaß der Strukturveränderungen und ihr Beitrag am Wärmesignal können von System zu System sehr unterschiedlich sein (122), (123). Thermodynamisch betrachtet führen diese Konformationsänderungen zwar oft zu einer Erhöhung der Entropie des Gesamtsystems. Der eigentliche Vorgang der Strukturänderung stellt allerdings oft einen endothermen Prozess dar (124). Um dessen Anteil am Gesamtwärmesignal quantifizieren zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die Abnahme der Peakenthalpien mit Voranschreiten der Titration deutet auf eine gewisse Sättigung des Systems hin. Die innere Oberfläche der eingesetzten SLN-Dispersion ist zwar groß, doch begrenzt. Durch die Proteinadsorption verringern sich die „unbesetzten“ Stellen auf der Partikeloberfläche, so dass eine Anlagerung direkt auf der Partikeloberfläche nur noch eingeschränkt möglich ist. Zur Beschreibung des Adsorptionsverhaltens von Proteinen an Nanopartikeln wird in der Literatur, allerdings bei Verwendung anderer Bestimmungsverfahren, oft das klassische Langmuir-Sorptionsisothermen-Modell verwendet (125), (126). Dabei geht man von einer homogenen Oberfläche des Trägermaterials aus, die eine begrenzte Anzahl an energetisch äquivalenten Adsorptionsplätzen hat. Die bei der Anlagerung freiwerdende Adsorptionswärme ist unabhängig vom Grad der Beladung des Trägers, Wechselwirkungen zwischen sorbierten und unsorbierten Molekülen werden demnach ausgeschlossen. Das Modell beschreibt weiterhin die Sorption nur bis zur Ausbildung einer vollständig besetzten monomolekularen Schicht.

Abbildung 4.24 zeigt die Entwicklung der Peakenthalpien für SLN unterschiedlicher Matrixzusammensetzung. Der P90G-Anteil der Matrix wurde zwischen 20 und 50% variiert. Die verschiedenen Systeme zeigen eine vergleichbare, gleichmäßige Abnahme der Peakenthalpien im Verlauf der Titration. Die absoluten Peakenthalpien der einzelnen Systeme sind hingegen verschieden, lassen jedoch in Anbetracht statistischer Abweichungen keinen Einfluss der Matrixkomposition auf das Adsorptionsverhalten erkennen.

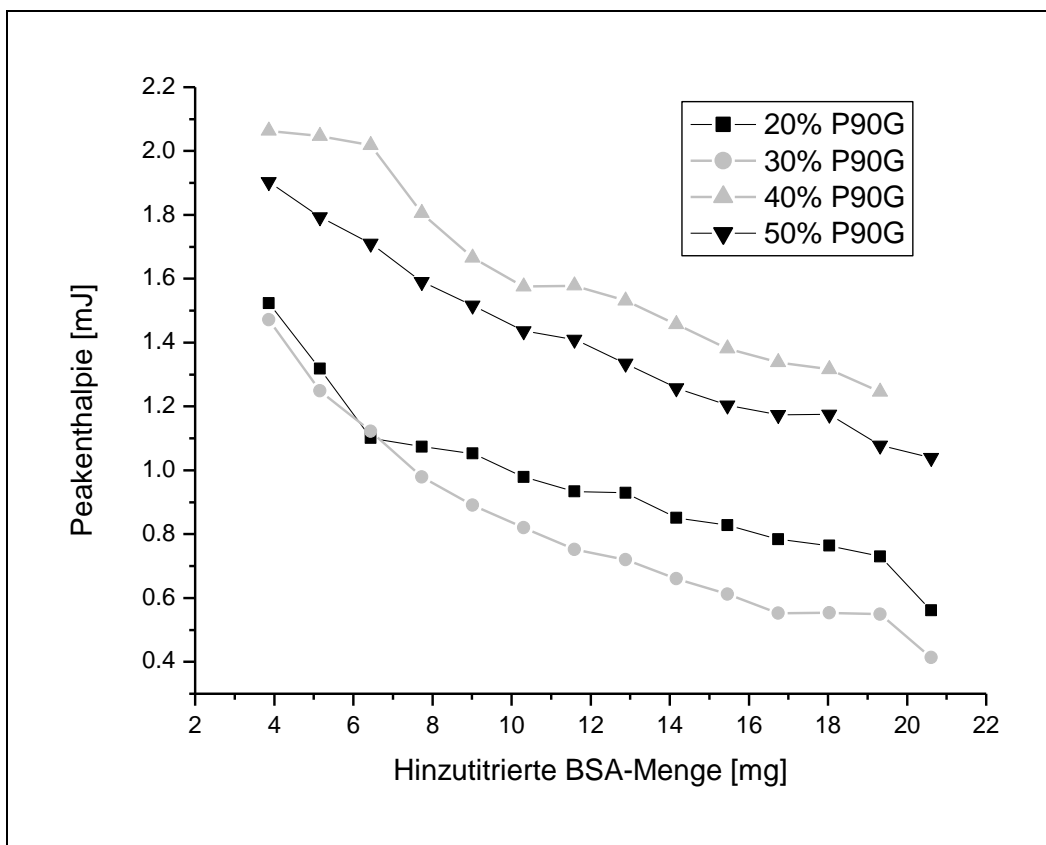


Abbildung 4.24: Aus IMC-Thermogrammen ermittelte Peakenthalpien der Titration von SLN (mit variierendem P90G-Anteil in der Lipidmatrix bei einem Matrixgehalt von 15%) mit BSA-Lösung

Die Peakenthalpien unterschiedlicher SLN-Chargen variieren teilweise erheblich<sup>4</sup> und auch die Relationen der Adsorptionsenthalpien verschiedener Systeme sind nicht konstant. Ein Vergleich der Adsorptionskapazitäten unterschiedlicher SLN-Rezepturen ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Ebenso wenig können die gemessenen Titrationsenthalpien an das Langmuir-Modell (125), (126) angepasst werden. Zwei Ursachen können dafür verantwortlich sein. Entweder sind beim untersuchten System nicht alle Voraussetzungen des Langmuir-Modells erfüllt, oder es treten parallel zur Adsorption weitere, von einem Wärmefluss begleitete Prozesse auf, die eine selektive Betrachtung der BSA-Adsorption verhindern.

<sup>4</sup> Die relative Standardabweichung für unterschiedliche Chargen des System mit 30% P90G in der Matrix liegt bei 43% (innerhalb der Charge n=2, verschiedene Chargen n=3).



#### 4.3.1.2 PCS-Messungen der SLN

Eine dauerhafte Adsorption von Proteinen an SLN sollte zu einer Zunahme der Partikelgröße führen. Aus TEM-Untersuchungen (119) ist ersichtlich, dass es sich bei den untersuchten SLN nicht um ideal sphärische, sondern elliptische, diskusförmige Partikel handelt. Allerdings geht man bei der Größenbestimmung durch die PCS von kugelförmigen Partikeln aus. Mit dem mittels PCS ermittelten Äquivalentdurchmesser ( $\ddot{A}D_{PCS}$ ) (siehe Tabelle 4.12a) können unter Annahme einer idealsphärischen Form nach Gleichung 4.4 die Partikeloberflächen ( $A_{ges}$ ) für 1 ml der unterschiedlichen SLN-Dispersionen abgeschätzt werden. Die eigentliche innere Oberfläche der SLN wird allerdings deutlich höher sein, weil zum einen das Verfahren nur die Ermittlung des hydrodynamischen Durchmessers erlaubt. Dieser wird durch das in der Grenzschicht angereicherte HS15 (119) deutlich über dem tatsächlichen Partikeldurchmesser liegen wird. Zum anderen zeigen die TEM-Aufnahmen (119), dass die Partikel circa doppelt so lang wie breit sind und dementsprechend eine deutlich größere Oberfläche besitzen.

Das für die Adsorptionsuntersuchungen verwendete BSA hat als monomeres Molekül mit einer Molekülmasse von 67 kDa in sphärischer Form einen Durchmesser von 7 nm. Ausgehend von einer dichten Kugelpackung des Proteins an der SLN-Oberfläche ergibt sich bei einem Titrationsvolumen von 12,88  $\mu$ l und einer BSA-Konzentration von 100 mg / ml eine potentiell wechselwirkende Proteinfläche von 1,782  $m^2$  pro Titrationsschritt. Parallel zur Adsorption kann es zu einer Konformationsänderung des Proteins in Form einer Molekülfaltung kommen. Deren Ausmaß hängt unter anderem von der Oberfläche und den Interaktionsmöglichkeiten der Sorptionspartner ab. Es kann dadurch zu einer Zunahme der Kontaktfläche zwischen Protein und Adsorbens und zu einer Verringerung der Schichtdicke der Proteinhülle kommen.

$$A_{ges} = \frac{3 \cdot m_{LM}}{\rho_{LM} \cdot r_{PCS}}$$

*Gleichung 4.4:  $A_{ges}$  ist die Partikeloberfläche / ml der jeweiligen SLN-Dispersion,  $m_{LM}$  ist die Masse der Lipidmatrix / ml SLN-Dispersion,  $\rho_{LM}$  ist die Dichte der Lipidmatrix,  $r_{PCS}$  ist der halbe durch PCS ermittelte Äquivalentdurchmesser der SLN*

Betrachtet man die durch PCS ermittelte Größenzunahme der SLN als Folge der Proteinbeladung, zeigt sich eine von der SLN-Oberfläche der Dispersionen linear abhängige Zunahme des Partikeldurchmessers (vergleiche Tabelle 4.12b). Inwieweit tatsächlich eine Partikelgrößenzunahme oder nur ein Anwachsen der Solvathülle in Folge der Proteinadsorption stattgefunden hat, lässt sich durch PCS-Messungen nicht differenzieren. Jedoch ist nach der Beladung der SLN-Dispersionen mit BSA eine Bildung von Agglomeraten durch die PCS-Messungen auszuschließen. Bei den Zubereitungen mit 40 und 50% P90G ist auch ohne Titration nach 21 Tagen eine leichte Zunahme der Partikelgröße zu beobachten. Von der zur Beladung der SLN eingesetzten 10%-igen BSA-Lösung ist bei den Systemen mit 20 und 30% P90G nur ein Teil des hinzutitrierten BSA dauerhaft an die SLN adsorbiert, anderenfalls müsste eine stärkere Partikelgrößenzunahme zu beobachten sein. Die Partikelgröße bzw. die Schichtdicke der Solvathülle nimmt mit voranschreitender Titration zu, es kommt aber im betrachteten Konzentrationsbereich in Bezug auf die Beladungskapazität zu keiner Sättigung des Systems. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der IMC überein. Ähnliche Ergebnisse zeigen auch Adsorptionsuntersuchungen mit BSA an oberflächenmodifizierten Lipid Nanopartikeln (126). Bei ähnlichen ebenfalls durch PCS ermittelten Äquivalentdurchmessern kam es bei BSA-Konzentrationen bis zu 40 mg / ml zu Zunahmen des Partikeldurchmessers um bis zu 17 nm.

*Tabelle 4.12a: Durch PCS ermittelte Partikelgröße ( $\bar{A}D_{PCS}$ ) und Polydispersitätsindex PI der beladenen und unbeladenen SLN (n=3). \*1 / \*2 keine signifikanten Unterschiede der Partikelgröße.*

		20% P90G	30% P90G	40% P90G	50% P90G
<b>PCS vor Titration</b>	$\bar{A}D_{PCS}$ [nm]	152 ± 1,3	90 ± 1,0	115 ± 0,4	107 ± 1,0
	PI	0,20 ± 0,014	0,20 ± 0,010	0,18 ± 0,023	0,16 ± 0,018
<b>PCS nach Titration</b>	$\bar{A}D_{PCS}$ [nm]	166 ± 1,7	92 ± 0,3	119 ± 0,5 * <sup>1</sup>	111 ± 0,7 * <sup>2</sup>
	PI	0,20 ± 0,011	0,14 ± 0,010	0,18 ± 0,021	0,19 ± 0,014
<b>PCS untitriert gelagert (3 Wochen)</b>	$\bar{A}D_{PCS}$ [nm]	152 ± 1,4	90 ± 0,5	118 ± 0,4 * <sup>1</sup>	110 ± 0,6 * <sup>2</sup>
	PI	0,22 ± 0,019	0,16 ± 0,008	0,18 ± 0,011	0,20 ± 0,010

Tabelle 4.12b: Abschätzung der Oberfläche und Veränderung des Partikeldurchmessers der SLN

<b>Oberfläche SLN-Partikel [m<sup>2</sup>/ml] (A<sub>ges</sub>)</b>	6,165	10,265	7,835	8,400
<b>Zunahme des Partikeldurchmessers durch BSA-Titration [nm]</b>	14	2	4	4
$Y = -2,8 * X + 28,82$				$r^2 = -0,89$

#### 4.3.1.3 Mögliche Ursachen für die Schwankungen der IMC-Signale

Eine Interpretation der Wärmeflusskurven ohne weitere Untersuchungen ist problematisch, weil sich mehrere Effekte überlagern. Eine Sättigung der Beladungskapazität konnte trotz der hohen eingesetzten Konzentration auch nach mehrfacher Titration der Dispersion nicht erreicht werden. Von Proteinadsorptionsuntersuchungen ist bekannt, dass sich oft zwischen sorbierten und desorbierten Molekülen ein dynamisches Gleichgewicht ausbildet (127). Bei hohen Proteinkonzentrationen, wie sie in den Untersuchungen eingesetzt wurden, kann es durch Wechselwirkungen gelöster Moleküle mit den adsorbierten Molekülen zu einer erleichterten Desorption kommen (128). Diese Desorptionseffekte können ebenfalls von Strukturveränderungen mit Auswirkungen auf das Wärmesignal begleitet sein. Bei den hohen BSA-Konzentrationen, die eingesetzt wurden, kann es, je nach Affinität, zur Ausbildung multimolekularer Proteinschichten kommen, noch bevor sich eine geschlossene monomolekulare Schicht auf den SLN gebildet hat. Dadurch kann die Adsorptionswärme, die von den Wechselwirkungen der Adsorptionspartner abhängt, vollkommen verändert sein.

Untersuchungen der SLN (119) haben gezeigt, dass die Oberfläche in Abhängigkeit des Lecithinanteils der Lipidmatrix aus mono- bis multimolekularen Lecithinschichten besteht, in die vereinzelt HS15-Moleküle eingestreut sind. Möglicherweise können bereits leichte Differenzen bei den Herstellungs- oder Lagerungsbedingungen strukturelle Unterschiede auf der Oberfläche der SLN hervorrufen und damit zu veränderten Adsorbenseigenschaften führen. Auch Veränderungen in der Zusammensetzung beziehungsweise Dicke der Solvathülle können Schwankungen in der Adsorptionswärme bedingen. Diese Faktoren könnten eine Erklärung für die Schwankungen der Adsorptionseenthalpien zwischen den einzelnen Chargen sein.

#### **4.3.2 Adsorptionsuntersuchungen an Liposomen**

Im Folgenden soll versucht werden, BSA-Adsorptionsuntersuchungen an Systemen mit einheitlicher, besser reproduzierbarer Oberfläche als bei den SLN durchzuführen. In Anlehnung an die Oberflächenstruktur und die Partikelgröße von SLN-Dispersionen bieten sich Liposomen als alternative kolloidale Arzneistoffträger an. Allerdings handelt es sich bei diesen Systemen nicht um eine starre Lipidmatrix, sondern um ein flexibles System, bei dem neben Adsorption auch eine Inkorporation der Arzneistoffe stattfinden könnte.

Für die Herstellung der Liposomen wurde die P90G-Konzentration der Liposomen-dispersionen an die der Nanopartikeldispersionen angepasst. Geht man davon aus, dass sich bei den SLN das eingesetzte P90G quantitativ in der Grenzfläche befindet, entspricht einer Nanopartikeldispersion mit einem Matrixgehalt von 15% und einem P90G-Anteil in der Matrix von 30%, eine unilamellare Liposomendispersion mit einem Lecithingehalt von 4,5%. Es wurden Rezepturen mit 2,5, 5,0 und 7,5% P90G eingesetzt.

##### **4.3.2.1 IMC der Liposomenbeladung**

Zunächst wurde die Stabilität der Liposomen nach ihrer Herstellung untersucht. Direkt nach ihrer Herstellung zeigten die Liposomendispersionen ein leicht exothermes Wärmesignal, das aber 12 – 15 Stunden nach ihrer Herstellung abgeklungen war. Die Beladung der Liposomen mit BSA erfolgte 14 Tage nach Herstellung bei Basislinienstabilität der jeweiligen Dispersionen analog zur SLN-Titration. Bei der Liposomentitration mit BSA-Lösung resultierten Titrationssignale, die in Verlauf und Intensität denen der SLN-Beladung vergleichbar waren. Die ersten beiden Titrationspeaks waren auch bei den Liposomentitrationen nicht reproduzierbar, im weiteren Verlauf wiesen die Liposomendispersionen allerdings erheblich geringere Schwankungen, auch bei unterschiedlichen Chargen, im Vergleich zu den SLN-Dispersionen auf. In Abbildung 4.25 sind die Peakenthalpien der verschiedenen Liposomen bei der Titration mit 10%iger BSA-Lösung dargestellt, die in Verlauf und Betrag denen der SLN-Beladung vergleichbar sind (vergleiche Abbildung 4.23). Im Unterschied zu den SLN ist bei den Liposomen eine Anpassung der Adsorptionseenthalpien an das Langmuir-Sorptionsmodell möglich.

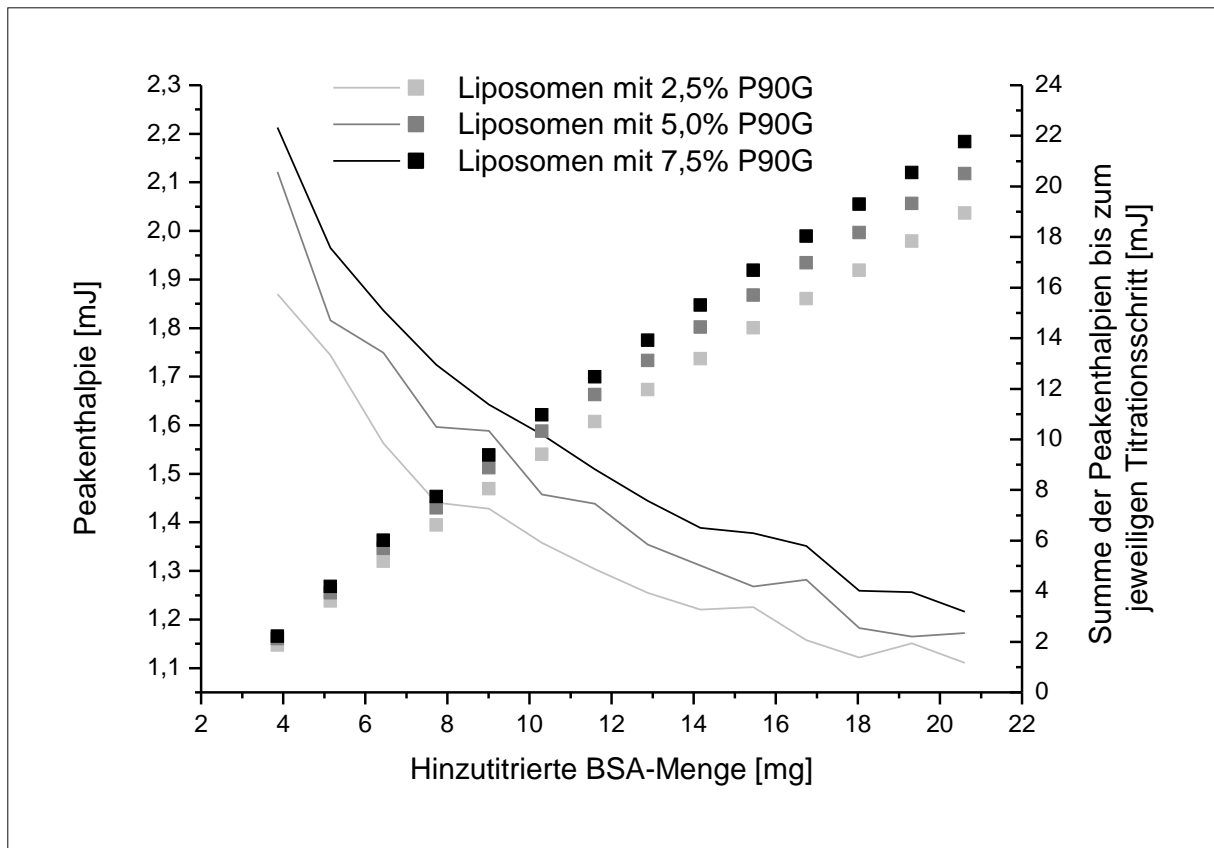


Abbildung 4.25: Aus IMC-Thermogrammen ermittelte Peakenthalpien (Linien) und deren Summation (Symbole) bei der Titration der Liposomendispersion mit BSA-Lösung

$$q = \frac{K_L \cdot q_{\max} \cdot m_{BSA}}{1 + K_L \cdot m_{BSA}}$$

Gleichung 4.5 (129)

Darin beschreibt  $q$  den adsorbierten Anteil des Proteins,  $K_L$  ist der Langmuir-Sorptionskoeffizient,  $q_{\max}$  ist die maximal sorbierbare Menge des Proteins und  $m_{BSA}$  ist die zugeführte Menge an BSA. Mit den aufsummierten Titrationsenthalpien, die mit der adsorbierten BSA-Menge korrelieren, ist zwar eine Anpassung an das Langmuiradsorptionsmodell möglich, allerdings ist die Aussagekraft gering, da nicht bekannt ist, welcher Anteil der hinzutitrierten Proteinmenge tatsächlich adsorbiert. Für die in Tabelle 4.13 angegebenen Parameter wurde eine vollständige Adsorption der hinzutitrierten BSA-Menge zugrunde gelegt, was allerdings mit Sicherheit nicht der Realität entspricht.

Tabelle 4.13: Parameter der Langmuiradsorptionsisothermen nach Modellanpassung der IMC-Peakenthalpien der Liposomentitration mit BSA-Lösung

Phospholipidgehalt	$K_L$	$q_{\max}$	Korrelationskoeffizient
2,5%	0,00594	167,68	0,99
5,0%	0,000368	2727,75	0,99
7,5%	0,000296	3583.92	0,99

Die Liposomen zeigen ebenfalls keine Sättigung der Beladung durch ein Absinken der Peakenthalpie auf die reine Verdünnungsenthalpie im betrachteten Konzentrationsbereich. Insgesamt ist der Kurvenverlauf der drei Rezepturen einheitlich, wenn auch in der Intensität der Signale verschoben. Die Formulierungen mit dem höchsten Lecithingehalt zeigen die stärksten Wärmesignale. Dies ist sicherlich damit zu begründen, dass diese Systeme eine größere Liposomenoberfläche aufweisen als die Systeme mit geringem P90G-Gehalt. Davon ausgehend, dass sich ein bestimmtes Verhältnis aus adsorbiertem und ungebundenem Protein ausbildet, resultiert bei einer hohen Liposomenkonzentration eine absolut betrachtet größere Menge an adsorbiertem BSA.

#### 4.3.2.2 PCS-Messungen der Liposomen

Die zur Proteinbeladung eingesetzten Liposomen zeigten innerhalb des Untersuchungszeitraums von drei Wochen keinerlei Veränderungen in Bezug auf die Partikelgröße und den Polydispersitätsindex. Durch die Proteinbeladung kam es bei den Liposomen zu einer geringen aber signifikanten Partikelgrößenzunahme (vergleiche Tabelle 4.14). Diese Zunahme war bei allen drei Formulierungen ähnlich.

Tabelle 4.14: Durch PCS ermittelte Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung der beladenen und unbeladenen Liposomen ( $n=3$ ,  $*p<0,05$ ).

		2,5% P90G	5,0% P90G	7,5% P90G
<b>PCS 1 Tag nach Herstellung</b>	$\bar{A}D_{PCS}$ [nm]	$48 \pm 0,3$	$65 \pm 1,0$	$70 \pm 0,5$
	PI	$0,18 \pm 0,007$	$0,25 \pm 0,005$	$0,25 \pm 0,004$
<b>PCS untitriert gelagert (3 Wochen)</b>	$\bar{A}D_{PCS}$ [nm]	$50 \pm 1,2$	$63 \pm 2,7$	$69 \pm 0,5$
	PI	$0,20 \pm 0,012$	$0,26 \pm 0,004$	$0,26 \pm 0,009$
<b>PCS nach Titration</b>	$\bar{A}D_{PCS}$ [nm]	$54 \pm 0,8$	$68 \pm 0,4$	$76 \pm 0,5$
	PI	$0,20 \pm 0,007$	$0,22 \pm 0,005$	$0,22 \pm 0,011$

Zunächst würde man bei der Proteinbeladung der Liposomen eine Proportionalität zwischen der eingesetzten Phospholipidmenge und der adsorbierten BSA-Menge erwarten. Setzt man die in Abbildung 4.25 aufsummierten Peakenthalpien nach der letzten BSA-Zugabe der drei unterschiedlichen Liposomendispersionen zueinander ins Verhältnis (vergl. Tabelle 4.15), erkennt man, dass diese Peakenthalpien nicht im Verhältnis 2,5 / 5,0 / 7,5 zueinander stehen.

Eine weitere Möglichkeit wäre ein Zusammenhang zwischen der Gesamtoberfläche der Liposomen und den aufsummierten Peakenthalpien. Um die Oberfläche zu berechnen, wird die Form eines unilamellaren Liposoms als Hohlkugel angenommen. Die Kugelhülle besteht aus einer 4,4 nm (130) dicken Phospholipiddoppelschicht ( $d_{Bi}$ ). Das Volumen dieser Hülle ergibt sich gemäß Gleichung 4.6 aus dem unter Verwendung des  $\Delta D_{PCS}$  (vergl. Tabelle 4.14) berechneten Kugelvolumen abzüglich des Volumens der innenliegenden Hohlkugel. Der Berechnung liegt die Annahme zu Grunde, dass die eingesetzte P90G-Menge vollständig in Form von Liposomen vorliegt.

$$V_{Bi} = \frac{\pi}{6} \cdot \left[ \Delta D_{PCS}^3 - (\Delta D_{PCS} - 2d_{Bi})^3 \right]$$

Gleichung 4.6

Die Anzahl der Liposomen / ml ( $n_{Lipo}$ ) der Dispersion ergibt sich gemäß Gleichung 4.7. Die Dichte des P90G ( $\rho_{P90G}$ ) wurde mit 1 g / cm<sup>3</sup> angenommen.

$$n_{Lipo} = \frac{m_{P90G/ml}}{\rho_{P90G} \cdot V_{Bi}}$$

Gleichung 4.7

Die Gesamtfläche der Liposomen / ml ( $A_{GesLipo}$ ) ergibt sich aus der Oberfläche eines Liposoms multipliziert mit der Anzahl der Liposomen / ml ( $n_{Lipo}$ ) nach Gleichung 4.8.

$$A_{GesLipo} = \pi \cdot \Delta D_{PCS}^2 \cdot n_{Lipo}$$

Gleichung 4.8

Durch die Ultraschallbehandlung kommt es zu einem hohen Energieeintrag, so dass zu einem großen Anteil unilamellare Liposomen entstehen (131). Einen rein unilamellaren Aufbau vorausgesetzt, würde sich ein Verhältnis der Oberflächen

( $A_{\text{GesLipo}}$ ) von 1 / 1,93 / 2,85 ergeben (vergleiche Tabelle 4.15). Dies entspricht ebenfalls nicht dem Verhältnis der aufsummierten Peakenthalpien.

Zwar ist die Wahrscheinlichkeit zur Bildung oligolamellarer Liposomen mit zunehmendem Lecithingehalt erhöht, eine Übereinstimmung zwischen dem Verhältnis der Liposomenoberflächen ( $A_{\text{GesLipo}}$ ) und dem Verhältnis der aufsummierten Peakenthalpien würde sich aber erst dann ergeben, wenn die Liposomen mit 2,5% Phospholipidgehalt aus einem Bilayer, die mit 5% im Mittel aus zwei Bilayern und die mit 7,5% im Mittel aus drei Bilayern aufgebaut wären. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich.

In Tabelle 4.15 ist beispielhaft ein Anteil an zusätzlich zum unilamellaren Aufbau vorhandenen Bilayern angenommen. Dieser Anteil scheint eher realistisch zu sein und ist so gewählt, dass eine Übereinstimmung zwischen dem Verhältnis der Peakenthalpien und dem Verhältnis der Anzahl der Liposomen resultiert. Dieser Zusammenhang zwischen Liposomenanzahl und der Titrationspeakenthalpie könnte darauf hindeuten, dass sich die BSA-Moleküle bevorzugt an unbeladenen Liposomen anlagern und die verfügbare Liposomenoberfläche sukzessiv für die Proteinadsorption bis hin zu einer gleichmäßigen Beladung der Liposomen genutzt wird. Die bei allen Systemen nahezu gleichmäßige Zunahme des Durchmessers und der nach der Beladung geringe Polydispersitätsindex unterstützen diese Vermutung.

*Tabelle 4.15: Gegenüberstellung der Summen der IMC-Peakenthalpien der Liposomentitration mit BSA (vergl. Abb. 4.25) und der Verhältnisse der Liposomenanzahl. Liposomenanzahl und Peakenthalpien sind für das 2,5%ige System gleich 1 gesetzt.*

Phospholipidgehalt	2,5%	5,0%	7,5%
Verhältnis der IMC-Peakenthalpien	1,00	1,12	1,19
Verhältnis der Oberfläche unilamellarer Liposomen	1,00	1,93	2,85
Beispielhaft angenommener Anteil an zusätzlichen Bilayern	2%	12%	34%
Verhältnis der Oberfläche uni- und oligolamellarer Liposomen	1,00	1,78	2,26
Verhältnis der Anzahl uni- und oligolamellarer Liposomen	1,00	1,12	1,19



#### **4.3.2.3 Eignung der IMC zur Detektion von Proteinadsorptionsvorgängen**

Die Beladung kolloidaler Arzneistoffträger mit Proteinen ist ein sehr komplexer Vorgang. Viele Prozesse, wie beispielsweise Adsorption, Desorption und Strukturveränderungen der Proteine, laufen parallel ab. Dabei kann sich jede Protein-Adsorbens-Kombination anders verhalten. Schon geringe Änderungen der Herstellungs- oder Versuchsbedingungen, wie pH-Wert, Temperatur- oder Konzentrationsänderungen können zu einem ganz anderen Verhalten des Systems führen. Grundsätzlich lassen sich Adsorptionsvorgänge mit der IMC erfassen. Spontan ablaufende Adsorptionen stellen einen Energiegewinn des Systems dar und erzeugen ein exothermes Wärmesignal. Die Detektion dieses Signals allein gibt allerdings keinen Aufschluss über Umfang und Art der Reaktion. Auch hier sind andere Verfahren notwendig, um das Wärmesignal interpretieren zu können.

Die untersuchten Nanopartikel sind grundsätzlich für eine Proteinbeladung durch Adsorption geeignet. Allerdings ist das Wärmeflussverhalten bei diesem System mit starken Schwankungen verbunden. Im Vergleich dazu zeigen die Liposomen ein deutlich besser reproduzierbares Verhalten. Dies könnte durch eine homogenere Oberflächenstruktur dieses Arzneistoffträgers bedingt sein.

#### **4.4 Mizellbildungsuntersuchungen mittels IMC**

Zur Ermittlung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) amphiphiler Substanzen in wässrigen Lösungen wird standardmäßig die Veränderung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit der Tensidkonzentration mit Hilfe eines Tensiometers bestimmt. Wie in den vorherigen Abschnitten bei den Proteinadsorptionsuntersuchungen und Stabilitätsuntersuchungen an Liposomen gezeigt wurde, reicht die Empfindlichkeit der IMC aus, um intermolekulare Wechselwirkungen zu detektieren. In der Literatur (132), (133) sind ebenfalls thermodynamische Untersuchungen an verschiedenen Assoziationskolloiden mit Hilfe der IMC durchgeführt worden. Zur Bestimmung der CMC mit der IMC werden über die Titrationseinheit in Intervallen kleine Mengen einer hochkonzentrierten mizellaren Lösung zum jeweiligen reinen Lösungsmittel in die Messzelle dosiert (vergl. Abbildung 4.26). Am Anfang des Experimentes kommt es aufgrund der geringen Tensidkonzentration in der Messzelle zur Demizellarisierung mit entsprechendem

Wärmefluss. Erst wenn die CMC in der Messzelle erreicht ist, bleiben auch dort Mizellen bestehen. An diesem Punkt ist eine deutliche Veränderung des Wärmesignals zu registrieren.

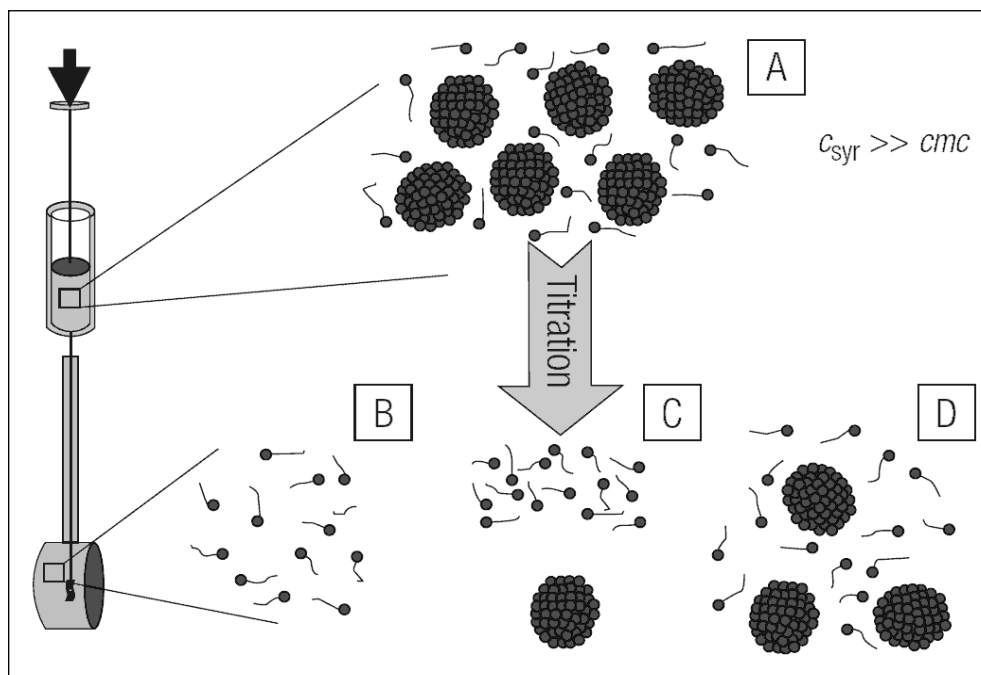


Abbildung 4.26: Schematische Darstellung (134) eines Demizellarisierungsexperiments mit der ITC: [A] ist eine deutlich oberhalb der CMC konzentrierte mizellare Tensidlösung, die in reines Lösungsmittel titriert wird. Es kommt zur vollständigen Demizellarisierung [B], solange in dem vorgelegten Lösungsmittel die CMC noch nicht erreicht ist. Ab Vorliegen der CMC [C,D] tritt keine Demizellarisierung mehr auf.

#### 4.4.1 Bestimmung der CMC von Natriumdodecylsulfat

In Abbildung 4.27 ist das Thermogramm einer Titration von Wasser mit einer mizellaren SDS-Lösung dargestellt. Zu Beginn der Titration kommt es nach SDS-Zugabe in die Messzelle zu einem exothermen Peak. Dieses Wärmesignal kommt zum größten Teil durch die Demizellarisierung der SDS-Mizellen zustande, parallel dazu bewirken die Verdünnungen sowohl der Mizellen als auch der Monomere einen Wärmefluss. Die Verdünnungsenthalpie der entstandenen Monomere ist vernachlässigbar gering. Sie wurde gesondert untersucht, indem eine sehr schwach konzentrierte SDS-Lösung – unterhalb der CMC – zu reinem Wasser titriert wurde (ohne Abbildung).

Der Zerfall von Mizellen ist bei diesem System ein exothermer Vorgang. Bei den darauffolgenden Titrationsschritten ist direkt nach Zugabe der mizellaren Lösung ein

endothermes Signal zu erkennen, dessen Anteil mit voranschreitender Titration bis zur CMC zunimmt. Auch nach Überschreiten der CMC bleibt das Signal im betrachteten Konzentrationsbereich bei weiteren SDS-Zugaben bestehen. Dieser Peak ist auf die Verdünnung der Mizellen zurückzuführen. Aufgrund der ionischen Oberfläche der Mizellen kommt es, insbesondere bei einer anwachsenden Konzentration an Mizellen, zu Abstoßungseffekten, Bildung von Gegenionen und einer Störung der Clusterstruktur, so dass insgesamt eine negative Verdünnungsenthalpie resultiert.

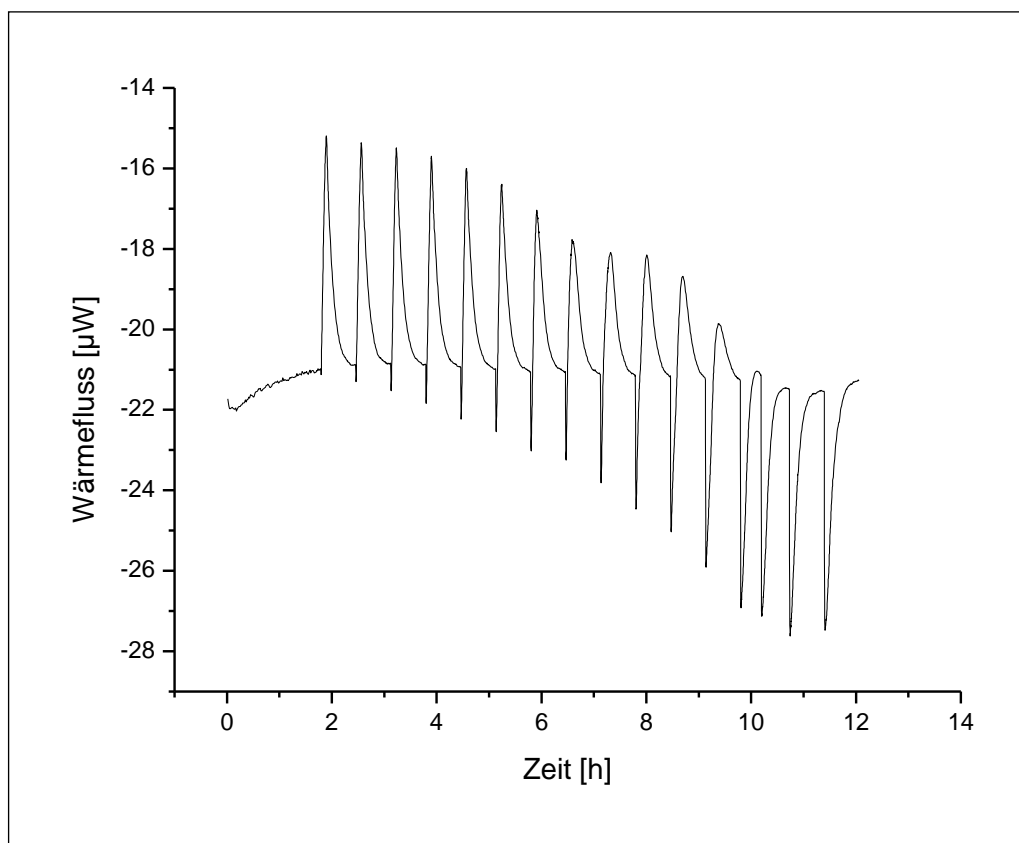


Abbildung 4.27: IMC-Thermogramm der Demizellarisierung einer mizellaren SDS-Lösung (50 mg / ml) bei einem Titrationsvolumen von 12,88  $\mu\text{l}$  / Titrationssschritt

Zur Bestimmung der CMC werden aus dem Thermogramm die Peakenthalpien der einzelnen Demizellarisierungspeaks ermittelt und gegen die SDS-Konzentration aufgetragen (vergleiche Abbildung 4.28). Von dieser Kurve bildet man die erste Ableitung, an deren Maximum sich die CMC befindet. Hiernach ist die CMC für SDS bei einer Konzentration von 0,24 % (m/m) erreicht. Dieser Wert stimmt mit dem Literaturwert (135) und dem tensiometrisch ermittelten Wert überein. Im Vergleich zu der CMC-Bestimmung mit dem Tensiometer anhand der Oberflächenspannung lässt

sich die CMC mittels der IMC deutlich genauer ermitteln. Allerdings ist diese Methode nicht für jedes Tensid geeignet. Für Polysorbat 20, das eine sehr niedrige CMC von 0,0074 % (m/m) aufweist, konnte beispielsweise mit der IMC aufgrund zu schwacher Titrationssignale bei der Demizellarisierung keine CMC ermittelt werden.

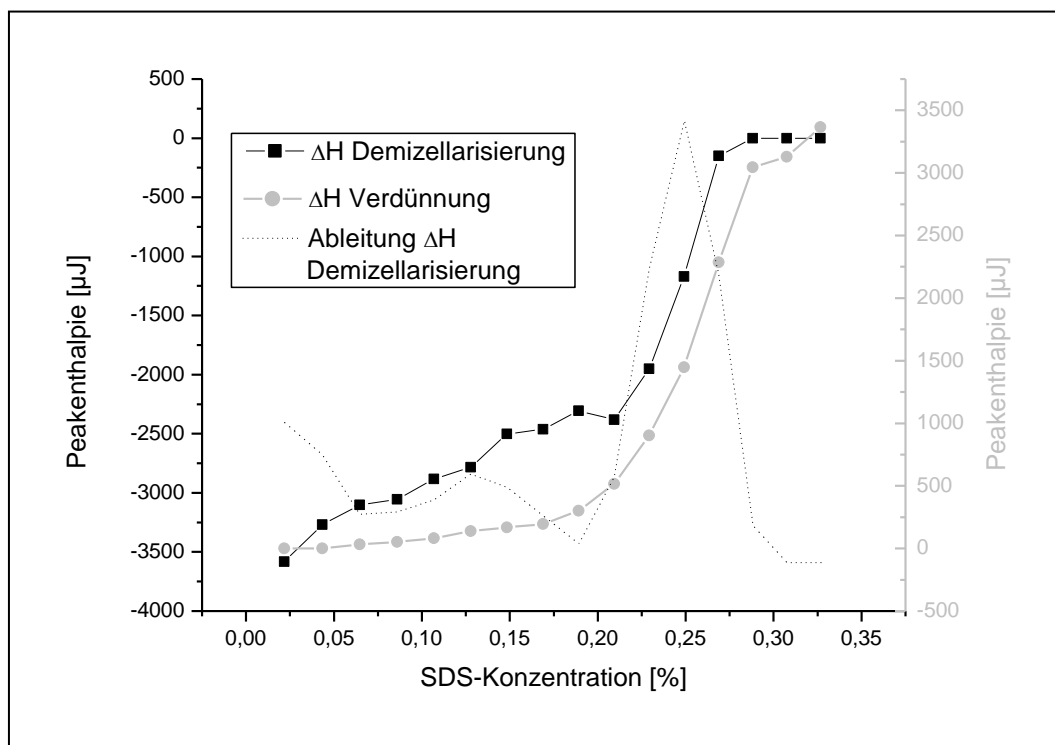


Abbildung 4.28: IMC-Peakenthalpien im Verlauf der Demizellarisierung einer mizellaren SDS-Lösung

#### 4.4.2 Mizellarisierungsuntersuchungen an Quillaja-Saponin (QA)

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Herrn T. Paepenmüller erzielt. Ergebnisse, die auf seinen Messdaten beruhen, sind durch die Abkürzung [Paep] gekennzeichnet. Es soll untersucht werden, ob das Mizellbildungsverhalten von QA mit der IMC verfolgt und charakterisiert werden kann. Nach Literaturangaben (136) erstreckt sich der Konzentrationsbereich für die CMC unter den gewählten Untersuchungsbedingungen auf 0,05 bis 0,08%. Dieser Bereich konnte durch Tensiometer-Messungen für die hier untersuchten Systeme bestätigt werden (137). Anhand von PCS-Messungen wurde für die QA-Mizellen eine Größe von 8,6 nm ermittelt (138).

Für die IMC-Demizellarisierungsexperimente wurde eine 1,5 %ige QA-Lösung in einzelnen Schritten von 12,88  $\mu l$  in 3000  $\mu l$  Wasser titriert. Da die Konzentration der eingesetzten QA-Lösung deutlich oberhalb der CMC lag, war eine Demizellarisierung

mit entsprechendem Wärmefluss bei Zugabe dieser mizellaren Lösung in Wasser zu erwarten. Vier Stunden nach Messbeginn wurde die Titration gestartet. Während der Titrationsphase über 11 h kommt es zu einem kontinuierlich ansteigenden Wärmesignal von ca. 0,5 auf 3  $\mu\text{W}$  (Abbildung 4.29). Im Gegensatz zur Demizellarisierungsuntersuchung der SDS-Mizellen sind keine einzelnen Titrations-signale zu erkennen. Nach Beenden der Titrationsphase fällt der Wärmefluss in den darauffolgenden 55 h in drei Schritten auf -0,3  $\mu\text{W}$  ab. Das Basislinienniveau ist im Vergleich zum Ausgangszustand um ca. 1,2  $\mu\text{W}$  reduziert.

Der gemessene Wärmefluss ist der zutitrierten QA-Lösung zuzuordnen. Obwohl keine einzelnen starken Wärmefluss-signale zu erkennen sind, werden während des langen Messzeitraums über knapp 70 h unter Berücksichtigung des Basisliniendriffs 229 mJ Wärme erfasst. Berechnet auf die hinzugefügte Menge an QA ergibt sich daraus eine Demizellarisierungswärme von 122 kJ/mol. In parallel durchgeführten Verdünnungsexperimenten konnte eine Demizellarisierung anhand von Tensiometer-Messungen belegt werden (137).

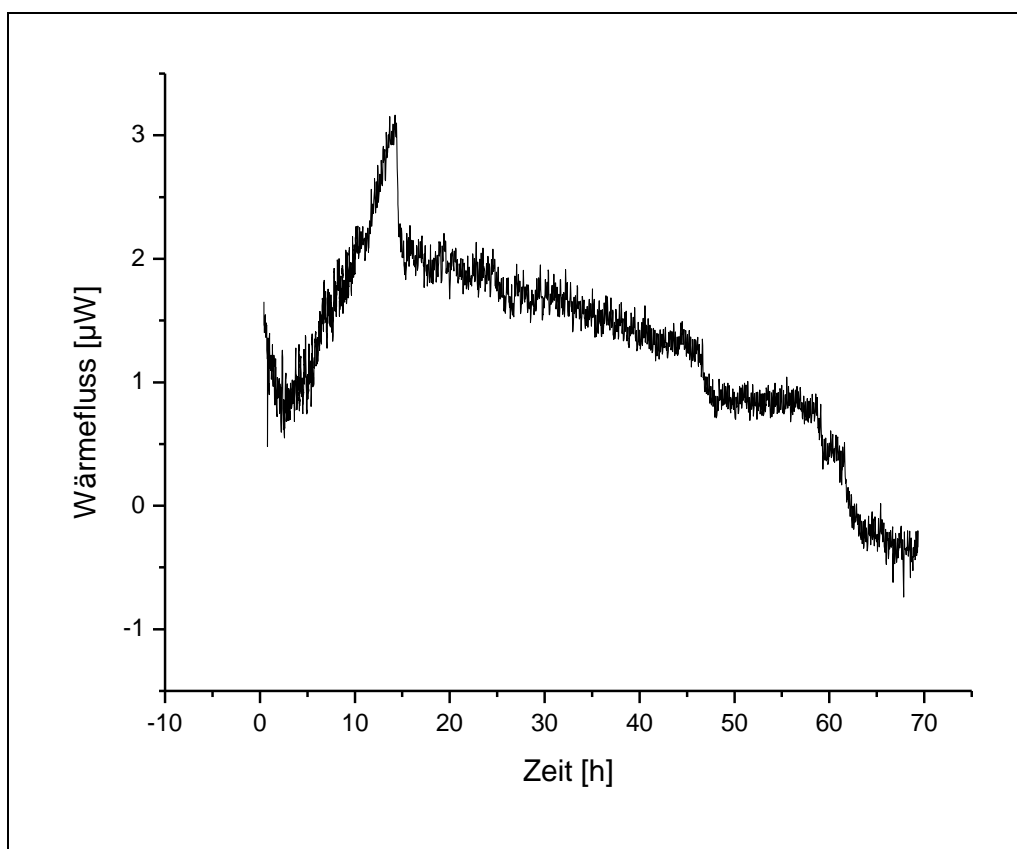


Abbildung 4.29: IMC-Thermogramm der Demizellarisierung einer mizellaren QA-Lösung in Wasser

Das IMC-Messergebnis deutet durch die Abwesenheit von einzelnen Titrationspeaks und das lang anhaltende, niedrige Wärmesignal auf einen sehr verzögerten Abbau der Mizellen hin. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine zum einen hohe, aber auch sehr unterschiedliche Stabilität der Mizellen. Für QA-Mizellen sind in der Literatur (136), (139) differierende Angaben zur Aggregationszahl von 33 bis über 100 zu finden. Diese Differenzen kommen zum einen durch unterschiedliche Bestimmungsverfahren und Rechenmodelle zustande, zum anderen unterscheiden sich aber auch die Chargen verschiedener Anbieter bei gleichen Messbedingungen um mehr als das 12-fache (135). Auch per PCS ermittelte Polydispersitätsindizes deuten teilweise auf eine sehr breite Größenverteilung hin. Ursache hierfür könnten einerseits Inhomogenitäten beim QA selbst aufgrund unterschiedlich zusammengesetzter Zuckerreste sein, andererseits können auch kleine Mengen an Verunreinigungen das Mizellbildungsverhalten erheblich beeinflussen. Bei PSC-Messungen der untersuchten mizellaren Lösungen waren oft große Partikel zu beobachten, deren Größe allerdings nicht reproduzierbar war (138).

Darüber hinaus konnte für andere triterpenoide Tenside, wie beispielsweise Gallensalze, ein stufenweiser Aufbau von Mizellen nachgewiesen werden (140), (141). Aus anfangs 2 – 10 Monomeren gebildete Primärmizellen schließen sich bei ansteigender Tensidkonzentration durch Vereinigung mehrerer Primärmizellen zu wurmförmigen Mizellen zusammen. Auch für hochreines QA konnte das Vorhandensein von zylinderförmigen Mizellen nachgewiesen werden, deren Ausdehnung entscheidend von der Reinheit des verwendeten Quil-A abhängt (142).

Ein inhomogenes Kollektiv an Mizellen kann unterschiedliche Stabilitäten aufweisen und damit bei IMC-Demizellarisierungsuntersuchungen zu einem verschmierten Wärmesignal führen. Denkbar wäre auch ein stufenweiser Abbau, insbesondere der zylinderförmigen Mizellen zu kleineren Aggregaten, so dass ein dynamischer Umbau der Mizellen, begleitet von einem Wärmefluss, ebenfalls für eine langanhaltende Wärmeentwicklung verantwortlich wäre. Unterschiedliche Vorgänge während des Zerfalls von Mizellen, wie beispielsweise Verdünnungseffekte, können bei einem derart verschmierten Signal nicht erkannt werden. Darüber hinaus ist bei einem Signal / Rausch-Verhältnis von 4:1 die Detektionsgrenze des Gerätes erreicht, so dass eine Aussage nicht möglich ist. Bei der Titration mit niedrig konzentrierten QA-Lösungen von 0,3% in Wasser war überhaupt kein Anstieg des Wärmesignals zu

beobachten. Eine detaillierte Detektion der Demizellarisierung war bei den QA-Mizellen mit der IMC nicht möglich.

#### 4.4.3 Charakterisierung inversmizellarer Lösungen mit der IMC

##### 4.4.3.1 Inversmizellare Lösung aus P90G und IPM

Im folgenden Abschnitt wird die Demizellarisierung einer inversmizellaren Lösung (IML) mit der IMC untersucht. Die IML besteht aus Phospholipon 90G, das in Isopropylmyristat (IPM) gelöst wurde. Bei diesem System ist davon auszugehen, dass Mizellen bereits bei sehr geringen Tensidkonzentrationen gebildet werden und eine Erhöhung der Tensidkonzentration zu einer kontinuierlichen Zunahme von Größe und Anzahl der Mizellen führt. Es ist anzunehmen, dass auch die Demizellarisierung der inversen Mizellen ohne eine sprunghafte Konzentrationsänderung verläuft.

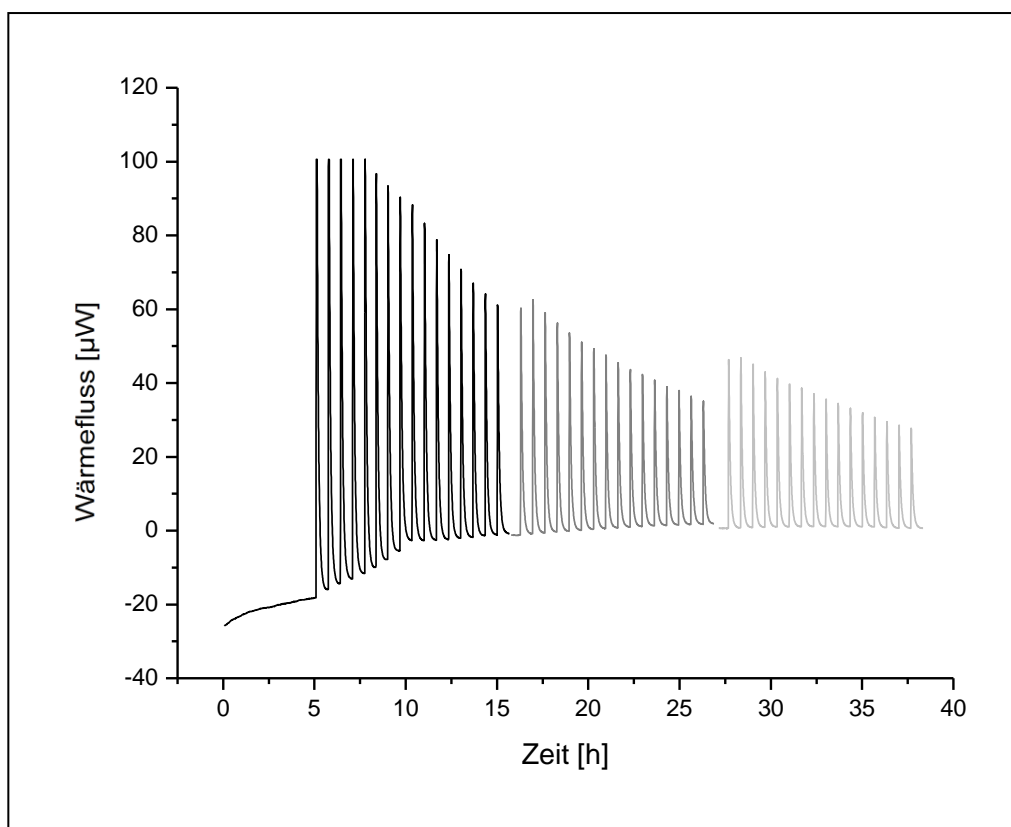


Abbildung 4.30: IMC-Thermogramm der Demizellarisierungs-Titration einer 7,5%igen inversmizellaren Lösung aus P90G / IPM in reines IPM

Abbildung 4.30 zeigt das Thermogramm einer Titrationsmessung, bei der eine IML von 7,5% P90G in IPM in 3000  $\mu\text{l}$  reines IPM titriert wurde. Nach 16 Titrations-schritten von je 12,88  $\mu\text{l}$  wurde die Titrationseinheit mit identischer IML neu befüllt und die Titration fortgesetzt. Bei jeder Zugabe der IML zu IPM kommt es zu einem exothermen Wärmesignal. Dieses Wärmesignal nimmt mit fortlaufender Titration kontinuierlich ab. Ein Versatz der Titrationspeaks nach Neubefüllung der Spritze ist methodenbedingt. Während der ersten sieben Titrationspeaks ist ein Anstieg der Basislinie um circa 16  $\mu\text{W}$  zu beobachten. Die Ursache für diesen Drift könnte eine Änderung der Wärmekapazität aufgrund der veränderten Zusammensetzung des vorgelegten Isopropylmyristats sein. Nachdem eine bestimmte Konzentration an Mizellen im Messraum erreicht ist, ändert sich die inversmizellare Lösung nicht mehr maßgeblich. Darüber hinaus deutet nichts auf eine sprunghafte strukturelle Veränderung der Probe hin. Während die Ausbildung inverser Mizellen grundsätzlich ein exothermer Vorgang ist, sollte der Zerfall dieser Mizellen demnach einen endothermen Wärmeﬂuss erzeugen. Die Verdünnungsenthalpie erzeugt dagegen ein exothermes Wärmesignal. Außerdem nähert sich das Titrationssignal bei gleichbleibender Zugabemenge asymptotisch der Basislinie an. Die fast lineare Abnahme des Peakintegrals ist ein typischer Kurvenverlauf für eine Verdünnungstitration. Die exothermen Titrationspeaks spiegeln daher die Verdünnungsenthalpie wider, die linear mit der ansteigenden P90G-Konzentration im Reaktionsgefäß abnimmt.

Untersuchungen mit einer zehnfach geringeren konzentrierten IML (0,743% P90G) und einem Titrationsvolumen von 8,58  $\mu\text{l}$  /Schritt zeigen einen entsprechenden Kurvenverlauf ohne sprunghafte Veränderung des Wärmeﬂusses (siehe Abbildung 4.31). Die Peakintegrale bleiben im betrachteten Konzentrationsbereich annähernd konstant und sind der Verdünnungsenthalpie zuzuweisen. Da die Konzentration an P90G durch so geringe Titrationsmengen kaum verändert wird, ist das Wärmesignal für eine genaue Betrachtung des Peakintegrals zu schwach. Eine Aussage über den P90G-Anteil, der in inversen Mizellen vorliegt, kann anhand der Thermogramme nicht getroffen werden.



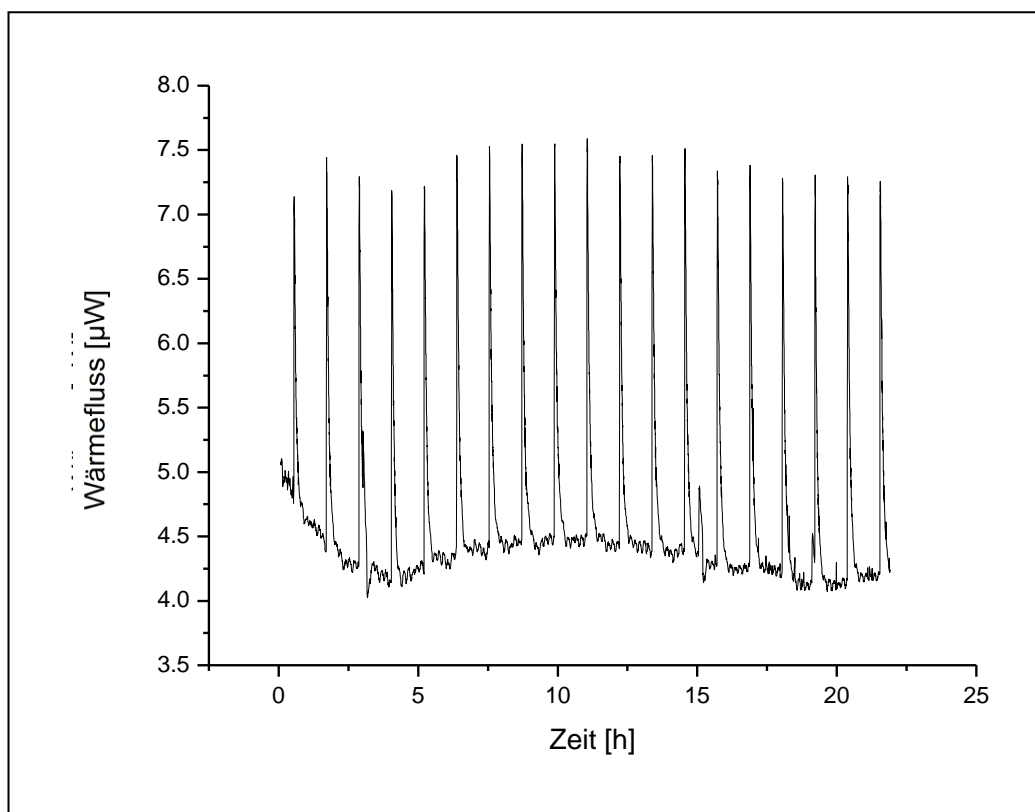


Abbildung 4.31: IMC-Thermogramm der Demizellarisierungstitration einer 0,743%igen inversmizellaren Lösung aus P90G / IPM in reines IPM

#### 4.4.3.2 Einfluss von Isopropylalkohol auf IML

In den folgenden Untersuchungen wurden 2 g einer IML aus 30% P90G und 70% IPM mit einem Gemisch aus 30% Isopropylalkohol (IPA) und 70% IPM in Schritten von 12,88 µl titriert, um den Einfluss des IPA auf die Struktur der IML zu untersuchen.

Das Thermogramm zeigt ab dem dritten Titrationspeak abfallende exotherme Titrationssignale. Ab diesem Titrationsfortschritt ist auch direkt nach Zugabe des IPA/IPM-Gemisches zur IML die Ausbildung eines kurzzeitigen endothermen Wärmesignals zu erkennen, dessen Anteil am Gesamtsignal stetig zunimmt. Ab einem IPA-Gehalt von knapp 1,2% dominiert der endotherme Teil des Signals. Wird nur reines IPM zur IML titriert, ist eine Verdünnungsenthalpie von nur 2,5 mJ / Titrationspeak zu messen. Die exothermen Peaks am Anfang der in Abbildung 4.32 dargestellten Titration weisen eine Enthalpie von etwa 196 mJ / Peak auf. Demnach ist IPA sowohl für die starken exothermen als auch für die im Anschluss folgenden endothermen Signale verantwortlich. Die auftretenden Wärmeflüsse und der

Umschwung der Titrationssignale von exotherm nach endotherm deuten auf eine Veränderung des Systems hin.

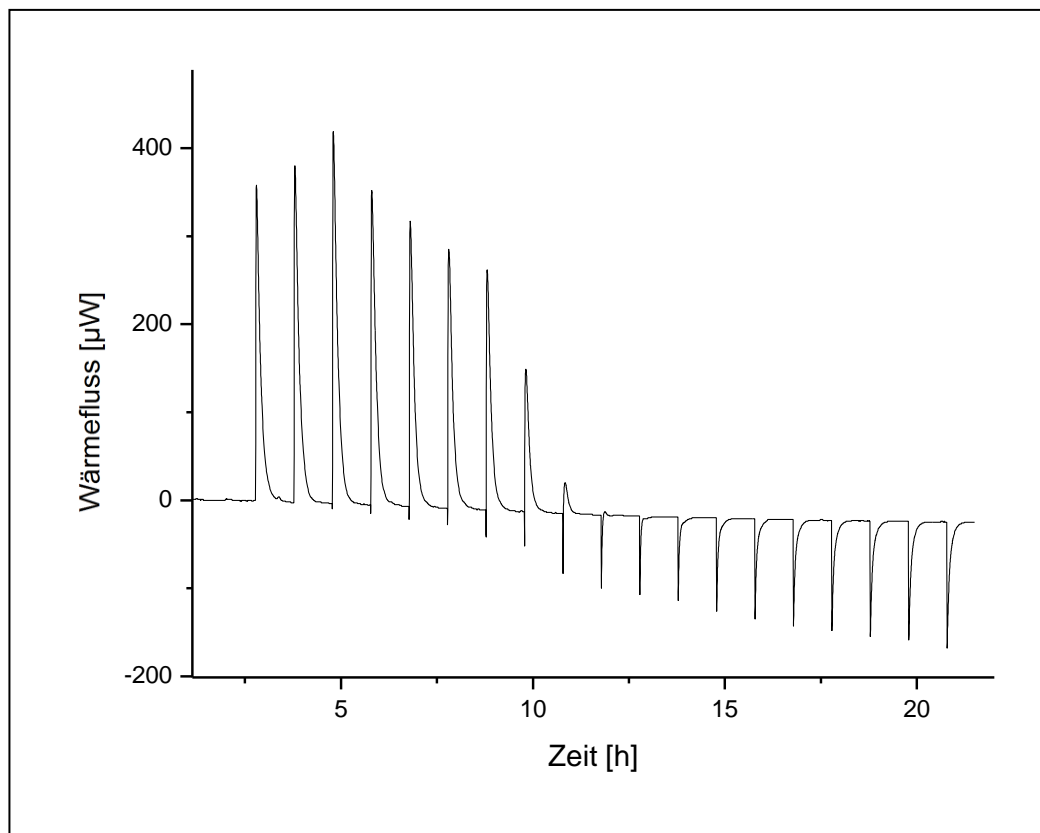


Abbildung 4.32: IMC-Thermogramm der Titration einer IML (aus 30% P90G und 70% IPM (m/m)) mit einer Mischung aus 30% IPA und 70% IPM (m/m)

Durch SAXS-Messungen an diesen Systemen (143) konnte eine Strukturänderung der inversen Mizellen durch den Zusatz von IPA nachgewiesen werden. Ohne IPA hatten die inversen Mizellen eine langgestreckte Form. Mit steigender Konzentration an IPA bis zu 1 – 2% konnte eine deutliche Reduktion in der Länge der inversen Mizellen beobachtet werden. Dieser Konzentrationsbereich liegt im Thermogramm im Bereich der exothermen Titrationssignale. Diese lassen auf eine stabilisierende Wechselwirkung des IPA mit dem inversmizellar strukturierten P90G schließen (vergleiche Abbildung 4.33). Die Abnahme der Mizellenlänge durch einen erhöhten IPA-Gehalt im System deutet auf eine verbesserte Wechselwirkung zwischen den lipophilen Ketten des P90G auch bei kleineren Radien der inversen Mizellen hin. IPA hat eine deutlich kleinere Molekülstruktur als IMP, deshalb kann es sich leichter zwischen die P90G-Moleküle setzen und Wechselwirkungen mit den lipophilen Resten des P90G eingehen. Die stabilisierenden Wechselwirkungen sind als

exotherme Titrationspeaks im Thermogramm zu sehen. Der lipophile Bereich der inversen Mizellen wird dadurch voluminöser und die Mizellen nehmen eine eher sphärische Form an.

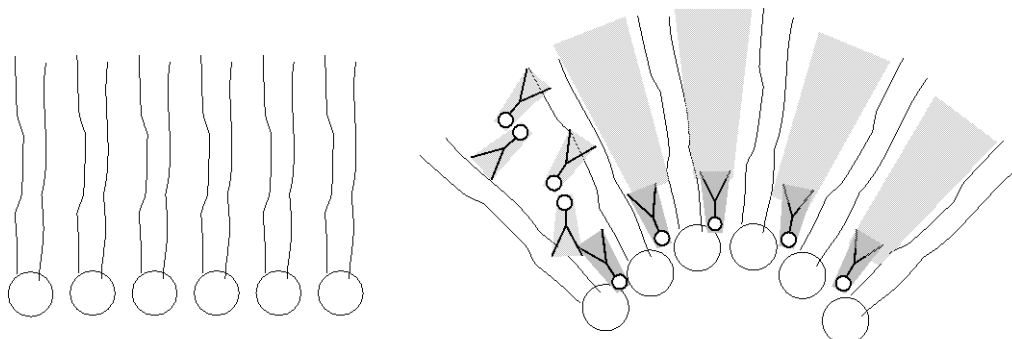


Abbildung 4.33: Schematischer Ausschnitt der inversen Mizellen links ohne, rechts mit IPA.

Der endotherme Teil am Anfang eines Titrationspeaks, der mit zunehmender IPA-Konzentration immer größer wird, ist wahrscheinlich dem Anteil an IPA zuzuordnen, der nicht in die inversen Mizellen integriert wird. Die Aufnahmefähigkeit der Mizellen für IPA ist beschränkt. Mit zunehmender IPA-Menge ist der Anteil, der sich zwischen die P90G-Moleküle lagert, reduziert. Oberhalb der Konzentration von 1,2% scheint eine Art Sättigung der Mizellen an P90G aufzutreten. Es überwiegt der endotherme Anteil im Wärmefluss. Diese nichtmizellar gebundenen IPA-Moleküle verändern die Lösungseigenschaften des Dispersionsmediums. Auch bei inversen Mizellen handelt es sich um dynamische Strukturen, bei denen ein Gleichgewicht aus inversmizellar gebundenen und freien Amphiphilen vorliegt. Durch eine Anreicherung von IPA im IPM wird die Polarität des Dispersionsmittelgemisches erhöht. Hieraus resultiert ein besseres Lösungsvermögen für P90G. Als Folge nimmt der Anteil an nichtmizellar gebundenem P90G im betrachteten System zu. Die Demizellarisierung ist von einem endothermen Wärmesignal begleitet. Diese Vermutung stimmt mit den Ergebnissen der Röntgenuntersuchungen (143) überein. Eine Abnahme der Streuintensität, die auf eine verminderte Konzentration inverser Mizellen hindeutet, ist ebenfalls ab einer IPA-Konzentration über 1 – 2% zu beobachten. Mit Hilfe der IMC ist der Sättigungsbereich der inversen Mizellen relativ genau zu bestimmen.

## 5 Abschlussdiskussion

### 5.1 Stabilitäts- und Kompatibilitätsuntersuchungen von Natrium-Diclofenac (DfNa) und amphiphiler Stärke (HICAP100)

#### 5.1.1 Stabilitätsuntersuchung von DfNa und Bildung eines Tetrahydrates

Die Stabilitätsuntersuchungen von Natrium-Diclofenac (DfNa) wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt. Bei 20 °C und 33% relativer Feuchte (rH) zeigte die Probe keinen Wärmefluss im IMC-Thermogramm. Daraus ist zu schließen, dass es zu keiner Veränderung des DfNa unter diesen Lagerbedingungen kommt. Bei Lagerbedingungen von 20 °C und 100% rH war bei den IMC-Messungen ein 7 Tage andauernder, nahezu ausschließlich exothermer Wärmefluss zu beobachten. Zur Untersuchung der chemischen Stabilität wurden HPLC- und IR-Untersuchungen durchgeführt. Beide Methoden gaben keinerlei Hinweise auf eine chemische Veränderung der Substanz. Parallel zu den IMC-Untersuchungen durchgeführte TG-, DSC- und WAXD-Messungen zeigten eine kontinuierliche Veränderung der Proben über den Lagerzeitraum. Diese Änderungen in den Thermogrammen und Diffraktogrammen können der Aufnahme von Kristallwasser und Bildung eines Tetrahydrates zugeordnet werden.

Die Lagerung von DfNa bei 40 °C und 100% rH führte im IMC-Thermogramm zu einem stärkeren, jedoch schneller abklingenden Wärmefluss. Die weiteren oben genannten Untersuchungen belegen ebenfalls die chemische Stabilität der Substanz und eine beschleunigte Wasseraufnahme und Bildung des Tetrahydrates.

Trocknungsversuche zur Regeneration des DfNa zeigten, dass das Hydratwasser unterschiedlich fest an das DfNa gebunden war. Bei einer Trocknungstemperatur über 50 °C ließ sich das DfNa-Tetrahydrat wieder vollständig in die kristallwasserfreie Form überführen. Anschließend konnte die Substanz wieder, wie oben beschrieben, hydratisiert werden. Der Prozess ist demnach vollständig reversibel.

### **5.1.2 Kompatibilitätsuntersuchung von DfNa mit amphiphiler Stärke (HICAP100)**

Untersucht wurde die Kompatibilität eines 1:1 Gemisches (m/m) von DfNa und HICAP100. Bei 20 °C und 33% rH zeigten weder die isolierten Substanzen noch die Kombination einen Wärmefluss im IMC-Thermogramm. Bei 20 °C und 100% rH waren in den IMC-Thermogrammen Wärmeflüsse des DfNa und auch der HICAP100 zu sehen, die durch die Hydratation der Substanzen entstanden sind. Die additive Mischung beider Substanzen zeigte nur geringe Abweichungen vom theoretisch zu erwartenden Ergebnis bei einer Kombination beider Reinstoffkurven. Diese leichten Differenzen sind einmal durch eine veränderte Gesamtpulvermenge und ein damit verändertes Oberflächen- / Volumenverhältnis zu begründen. Außerdem verhalten sich nicht alle Faktoren, die die Aufnahme und den Transport von Feuchtigkeit innerhalb von Feststoffen beeinflussen rein additiv. Somit ist von einer Kompatibilität beider Mischungspartner auszugehen. Bei einer Messtemperatur von 40 °C liefen die Hydratationsprozesse beschleunigt ab. In Bezug auf die Kompatibilität kam es zum gleichen Ergebnis.

## **5.2 Charakterisierung des Kristallisationsverhaltens von Lecithin-Hartfettgemischen**

### **5.2.1 Kristallisationsverhalten P90G-haltiger Lipidmatrices**

Es wurden binäre Gemische aus Hartfett (S154) und dem gereinigten Sojalecithin Phospholipon 90G (P90G), dessen Fettsäureketten teilweise ungesättigt sind, hergestellt. Der P90G-Anteil wurde von 10 – 50% variiert. Direkt nach dem Aufschmelzen und Abkühlen der Matrix auf 20 °C wurden IMC-Thermogramme aufgezeichnet, um den Verlauf der Kristallisationswärme zu detektieren. Die Thermogramme zeigten einen vom P90G-Gehalt abhängigen Verlauf der Rekristallisation. Am Anfang der Messungen zeigten alle Systeme ein stark abfallendes exothermes Wärmesignal, das der Kristallisation zuzuordnen war. Im weiteren Verlauf war mit steigendem P90G-Anteil der Matrix ein beschleunigtes, steiles Ansteigen des Wärmeflusses zu beobachten. Durch parallel durchgeführte DSC- und WAXD-Messungen konnte das ansteigende Wärmesignal einer Modifikationsänderung des Hartfettanteils zugeordnet werden. Diese wird

offensichtlich durch die Anwesenheit des P90G beschleunigt. Die in den Diffraktogrammen gemessenen Interferenzen deuten auf die Entstehung der metastabilen  $\beta'$ -Modifikation hin. Die thermodynamisch stabile  $\beta$ -Modifikation entsteht erst nach längerer Lagerung. Auch in den DSC-Thermogrammen und den WAXD-Diffraktogrammen ist der beschleunigende Einfluss des P90G auf die Modifikationsumwandlungen zu sehen. Die Schmelzenthalpien in den DSC-Thermogrammen hängen linear vom Hartfettanteil der Matrix ab. Das Phospholipid selbst zeigt keine Phasenumwandlung und trägt deshalb nicht zur Schmelzenthalpie bei.

### 5.2.2 Kristallisationsverhalten P90G-haltiger SLN

Mit den zuvor beschriebenen Lipidmatrices wurden bei einer Temperatur von 50 °C durch Hochdruckhomogenisation SLN-Dispersionen hergestellt. Direkt nach ihrem Erkalten wurden IMC-Thermogramme aufgezeichnet, in denen die Dispersionen ein schnell absinkendes, exothermes Wärmeflussignal ohne einen erneuten Anstieg zeigen. Es sind keinerlei Anzeichen für eine Modifikationsänderung zu erkennen. Vergleicht man das tangentielle Gefälle der Wärmeflusskurven, das einen Rückschluss auf die Kristallisationsgeschwindigkeit zulässt, so zeigt sich, wie bei der Bulk-Substanz, eine Beschleunigung der Rekristallisation durch einen zunehmenden P90G-Anteil der Lipidmatrix. Parallel durchgeführte WAXD-Messungen zeigen ebenfalls bei allen SLN bereits einen Tag nach Herstellung die Interferenzen der stabilen  $\beta$ -Modifikation. Auch in den DSC-Thermogrammen ist von Anfang an nur ein Schmelzpeak zu erkennen. Allerdings benötigt das System mit nur 10% P90G im Matrixanteil mehr als 2 Stunden, bis sich die stabile  $\beta$ -Modifikation gebildet hat und deren Schmelztemperatur nachweisbar ist. Dies liegt an der verzögerten Rekristallisation aufgrund des geringen P90G-Anteils. Allgemein ist in den DSC-Thermogrammen eine deutliche Depression der Schmelz- und Erstarrungstemperaturen durch die Dispersion der Lipidmatrix zu beobachten. Ursache dafür ist ein sehr großes Oberflächen- / Volumenverhältnis der Dispersion.

Anhand der IMC-Wärmeflusskurven der SLN-Rekristallisation ist eine Ermittlung der Kristallisationsparameter nach Avrami möglich. Danach nimmt die Geschwindigkeitskonstante, mit der die Phasenumwandlung abläuft, zu, der Avrami-Exponent,

der die dimensionale Ausdehnung des Kristalls beschreibt, nimmt hingegen ab bei steigendem Phospholipidgehalt. Offensichtlich beschleunigt ein hoher P90G-Anteil das Kristallwachstum, schränkt jedoch gleichzeitig die Ausbreitungsrichtungen ein.

Bei Variation der Solutkonzentration ist eine umgekehrte Proportionalität der Partikelgröße und des Polydispersitätsindex zur Emulgatorkonzentration zu erkennen. Hohe HS15-Konzentrationen führen zu kleinen, eng verteilten SLN-Dispersionen. In den IMC-Thermogrammen der Rekristallisationsuntersuchungen ist bei allen HS15-Konzentrationen ein kontinuierlich abfallendes Wärmesignal ohne Hinweis auf eine Modifikationsänderung zu sehen. Die Dispersionen zeigen mit steigendem HS15-Anteil einen in Intensität und Geschwindigkeit reduzierten Wärmefluss. Auch die DSC-Untersuchungen dieser Systeme deuten durch eine verminderte Schmelzenthalpie und Verbreiterung der Schmelzpeaks auf eine Beeinträchtigung der Kristallinität durch einen zunehmenden HS15-Anteil hin. Ob das HS15 selbst oder die geringe Partikelgröße für die verminderte Kristallinität verantwortlich sind, kann nicht abschließend beurteilt werden.

### **5.2.3 Kristallisationsverhalten P90H-haltiger Lipidmatrices und SLN**

Die untersuchten Lipidmatrices wurden aus S154 und zu einem Massenanteil zwischen 10 – 50% aus gereinigtem Sojalecithin mit vollständig hydrierten Fettsäureketten (P90H) hergestellt. Die IMC-Thermogramme der Matrixrekristallisation zeigen für alle Rezepturen einen nahezu deckungsgleichen Verlauf. Im Gegensatz zu den P90G-haltigen Systemen verläuft hier die Rekristallisation ohne eine Änderung der Modifikation unabhängig vom P90H-Anteil der Matrix. Es ist davon auszugehen, dass sofort die stabile  $\beta$ -Modifikation entsteht.

SLN-Dispersionen konnten mit einem Matrixgehalt von 15% nur aus Matrices mit 10 und 20% P90H hergestellt werden. Die IMC-Thermogramme zeigen wieder einen schnell und kontinuierlich abfallenden Wärmefluss. Es findet keine Modifikationsänderung mehr statt.

### **5.3 Adsorption des Modelproteins BSA an kolloidale Wirkstoffträger**

SLN mit unterschiedlichem P90G-Anteil in der Matrix wurden während der Aufnahme eines IMC-Thermogramms mit einer BSA Lösung titriert. Durch die Zugabe und Adsorption des BSA an die SLN kam es zu exothermen Titrationspeaks im Thermogramm. Eine Abhängigkeit des Adsorptionsverhaltens von der Matrixkomposition der SLN konnte nicht nachgewiesen werden. Allgemein waren die Titrations-signale recht großen Schwankungen unterlegen. Die Ursache dafür sind wahrscheinlich einerseits Abweichungen in der Oberflächenbeschaffenheit der SLN, andererseits werden sich bei der Zugabe der BSA-Lösung mehrere wärmeaus-tauschende Prozesse überlagern. Eine selektive Erfassung des Adsorptionsvorgangs ist mit der IMC nicht möglich.

Durch PCS-Messungen der SLN war als Folge der BSA-Beladung eine Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers festzustellen. Beide Methoden erlaubten keine Quantifizierung der adsorbierten Proteinmenge.

Durch Ultraschalldispergierung hergestellte, größtenteils unilamellare Liposomen wurden ebenfalls einer Titration mit BSA-Lösung unterzogen. Die dabei aufge-zeichneten IMC-Thermogramme weisen deutlich geringere Schwankungen als bei der SLN-Beladung auf und ermöglichen eine Anpassung der Wärmeflusskurven an das Langmuir-Adsorptionsmodell. Die Adsorptionswärmen nehmen mit steigender P90G-Konzentration zu. Allerdings besteht keine direkt lineare Abhängigkeit der Titrationspeakenthalpien zum P90G-Gehalt. Vielmehr konnte ein Zusammenhang zwischen der aufsummierten IMC-Titrationsenthalpie und der Anzahl an Liposomen in der Dispersion festgestellt werden. Somit besteht die Vermutung, dass die Protein-adsorption bevorzugt an unbeladenen Liposomen stattfindet.

Die unbehandelten Liposomendispersionen zeigten während der dreiwöchigen Lagerung bei den PCS-Untersuchungen keinerlei Veränderungen. Durch die Titration mit BSA-Lösung war eine Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers zu beobachten. Ob diese Zunahme ausschließlich auf Schichten adsorbierter BSA-Moleküle zurückzuführen ist oder ob sich aufgrund der durch Adsorption veränderten Oberfläche die Dicke der fest gebundenen Solvathülle geändert hat, konnte nicht abschließend geklärt werden.



## **5.4 Mizellarisierungsverhalten unterschiedlicher Assoziationskolloide**

Durch Demizellarisierungstitation, deren Wärmefluss mit der IMC verfolgt wird, ist für SDS eine einfache und genaue Bestimmung der CMC möglich. Allerdings ist diese Methode nicht universell für alle Tenside einsetzbar. Für Polysorbat 20 und Quil-A ließ sich aufgrund nur sehr schwacher Titationssignale keine CMC ermitteln. Bei den Demizellarisierungsversuchen mit Quil-A war noch lange nach Beendigung der Zugabe der mizellaren Lösung zu Wasser ein schwacher Wärmefluss zu beobachten. Es besteht die Möglichkeit, dass ein Um- oder Abbau der Mizellen nur sehr langsam und schrittweise erfolgt und deshalb keine deutlichen Titrationspeaks im Thermogramm zu erkennen waren.

Für inversmizellare Lösungen (IML) aus 30% P90G und 70% IPM konnte mit IMC-überwachten Demizellarisierungstitationen keine CMC ermittelt werden. Die Thermogramme zeigen mit voranschreitender Titration gleichmäßig abnehmende Titrationspeaks, die auf eine reine Verdünnungsenthalpie und nicht auf eine Demizellarisierung hindeuten. Dies stimmt mit den Erwartungen überein, weil auch die Entstehung inverser Mizellen einen kontinuierlichen Prozess darstellt. Eine sprunghafte Änderung der Konzentration an inversen Mizellen ist in der Regel nicht zu beobachten.

Bei der Titration der genannten IML in ein Gemisch aus 30% IPA und 70% IPM kam es im IMC-Thermogramm zu exothermen Titrationspeaks, deren Enthalpie mit voranschreitender Titration abnahm. Ab einer Konzentration von 1,2% IPA in der IML war ein Wechsel des Titationssignals in den endothermen Bereich zu beobachten. Durch ergänzende SAXS-Messungen (143) konnte der Verlauf des Thermogramms interpretiert werden. Bei IPA-Konzentrationen unterhalb von 1,2% kommt es zur Integration des IPA in die P90G-Hülle der inversen Mizellen. Bei diesem relativ schnell ablaufenden, exothermen Vorgang wird die Stabilität der inversen Mizellen erhöht, und es ist eine Verkürzung der zuvor länglichen hin zu sphärischen Mizellen zu beobachten. Nachdem die P90G-Hülle der inversen Mizellen an IPA nahezu gesättigt ist, verbleibt IPA bei weiterer Zugabe im IPM. Dadurch kommt es zu einer verbesserten Löslichkeit des P90G im Dispersionsmedium. Als Konsequenz davon werden inverse Mizellen zu Gunsten von gelöstem P90G abgebaut. Dieser Vorgang ist im Thermogramm an den endothermen Titationssignalen zu erkennen.

## 5.5 Abschließende Beurteilung der IMC

Die IMC kann als vielseitiges Verfahren zur Charakterisierung unterschiedlicher Systeme eingesetzt werden. Soll die Veränderung einer Probe ausgeschlossen werden, wie es bei Stabilitätsuntersuchungen der Fall ist, deckt die IMC ein sehr weites Feld möglicher Veränderungen ab. Kommt es jedoch bei den Untersuchungen zu einem Wärmeaustausch, kann allein aufgrund des Thermogramms kaum eine Aussage über die Veränderung der Probe getroffen werden. Es sind zur Aufklärung des Messsignals immer noch weitere Verfahren notwendig, wie beispielsweise bei den Untersuchungen an DfNa zu sehen war.

Ein Vorteil der IMC ist ihre hohe Empfindlichkeit. Einige Probenveränderungen können mit dieser Methode genauer erfasst werden als mit konventionellen Methoden. Die CMC-Bestimmung von SDS ist mit einem Tensiometer nicht so exakt möglich wie mit der IMC.

Dadurch, dass die Wärmeflüsse lückenlos aufgezeichnet werden, erhält man ein sehr anschauliches Bild der Umwandlung. Die Vielzahl der Messwerte lässt auch bei schnellablaufenden Ereignissen eine Modellanpassung und Berechnung der Reaktionskinetik zu. Allerdings kann angesichts der ununterbrochenen Wärmeaufzeichnung bei zum Teil recht langen Messzeiten nur eine begrenzte Probenanzahl gemessen werden. Das Nachfolgemodell TAM III des in dieser Arbeit verwendeten TAM 2277 ist mit bis zu 48 Messkanälen ausgestattet, um größere Probenaufkommen zu bewältigen. Eine weitere sinnvolle Neuerung beim TAM III ist der Temperatur-Scanningbetrieb während einer Messung, so dass Einflüsse der Temperatur auf die Probe direkt erkannt werden können.

Ein generelles Problem der IMC ist bei mehreren parallel ablaufenden, wärmeaus-tauschenden Prozessen zu beobachten. Es kommt zur Überlagerung der einzelnen Wärmesignale. Sind die Wärmeflüsse einzelner Teilprozesse nicht bekannt, kann eine Aufspaltung des Summensignals nicht errechnet werden. Eine Beurteilung des Ausmaßes der einzelnen Vorgänge ist dann nicht möglich.

Bei statischen Messungen ist zu berücksichtigen, dass zusätzlich zur Probenvor-bereitung eine Equilibrierungszeit von mindestens 30 Minuten hinzukommt. Für sehr schnell ablaufende Prozesse kommt diese Messtechnik daher nicht in Betracht. Jedoch besteht die Möglichkeit, der Probe während einer Messung Reaktionspartner durch Titration oder Perfusion zuzuführen. Auftretende Wechselwirkungen können somit direkt detektiert werden.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anwendbarkeit der isothermalen Mikrokalorimetrie (IMC) für unterschiedliche physikochemische Fragestellungen zu untersuchen. Dabei standen verschiedene Arten molekularer Interaktionen im Mittelpunkt.

Diclofenac-Natrium zeigte im IMC-Thermogramm bei Messbedingungen von 20 °C und 100% rH über 7 Tage einen andauernden, exothermen Wärmefluss, der der Entstehung eines Tetrahydrates von DfNa zugeordnet werden konnte. Bei einer Temperatur von 40 °C läuft dieser Prozess beschleunigt ab. Durch Trocknung oberhalb von 50 °C ist eine vollständige Regeneration in die kristallwasserfreie Form möglich. Dieser Vorgang ließ sich durch die IMC gut verfolgen. Die Zuordnung des Wärmeflusses zu Hydratations- und Dehydratationsprozessen erfolgte durch HPLC-, IR-, DSC-, TG- und WAXD-Messungen.

Amphiphile Stärke (HICAP100) zeigt bei 20 °C, 100% rH während der Aufnahme von Wasser ebenfalls einen exothermen Wärmefluss. Auch hier ist bei 40 °C aufgrund des erhöhten Dampfdrucks eine Beschleunigung zu beobachten. Die 1:1 Kombination von DfNa und HICAP100 führt bei 100% rH zu einer Wärmeflusskurve, die geringe Abweichungen von der rechnerisch ermittelten Kurve beider Reinsubstanzen in wassergesättigter Atmosphäre zeigt. Es ist davon auszugehen, dass die Abweichungen durch veränderte Wasseraufnahmeeigenschaften der Mischung entstehen und dass eine Kompatibilität beider Mischungspartner gegeben ist.

Die Rekristallisation eines Gemisches aus Phospholipid (P90G) und Hartfett konnte mit der IMC als schnell abfallende Wärmeflusskurve dargestellt werden. In Abhängigkeit des P90G-Anteils war ein erneutes, unterschiedlich starkes Ansteigen der Wärmekurve zu beobachten. Dieses aufkommende Wärmesignal konnte durch ergänzende DSC- und WAXD-Messungen einer Modifikationsänderung des Hartfettes zugeordnet werden, die durch zunehmenden P90G-Anteil bis 50% beschleunigt abläuft. Aus dieser Lipidmatrix hergestellte SLN-Dispersionen zeigten bei allen Methoden (IMC, DSC, WAXD) keine Modifikationsänderung während der Rekristallisation. Bei Veränderung der Konzentration an nichtionischem Tensid (Solutol HS15) war im IMC-Thermogramm ein reduzierter und verzögerter

Wärmefluss mit zunehmendem Tensidanteil zu beobachten, der auf eine Verzögerung der Rekristallisation schließen lässt.

Der Austausch des P90G gegen ein Lecithin mit vollständig hydrierten Fettsäureketten (P90H) führte dazu, dass die Rekristallisation der Lipidmatrix ohne Modifikationsänderung abläuft. Dies trifft auch für die daraus hergestellten SLN zu. Das Kristallisationsverhalten der unterschiedlichen Hartfettzubereitungen konnte, ergänzt durch DSC- und WAXD-Messungen, mit der IMC gut charakterisiert werden. Die Modifikationsänderungen konnten anschaulich dargestellt werden. Durch die Empfindlichkeit der Methode war es möglich, auch geringe Unterschiede in der Kristallisationskinetik zu erkennen.

Bei den Adsorptionsuntersuchungen von BSA an SLN waren große Schwankungen in den IMC-Titrationsthermogrammen zu beobachten. Die Methode ist für die Detektion des Adsorptionsvorgangs beim betrachteten System wenig geeignet. Im Vergleich dazu war die Beladung der Liposomen mit BSA mit deutlich geringeren Schwankungen verbunden. Bei beiden Systemen war durch PCS-Messungen eine Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers in Folge der BSA-Titration festzustellen. In den IMC-Thermogrammen war trotz hoher BSA-Konzentrationen kein Hinweis auf eine Sättigung der Beladungskapazität zu erkennen. Quantitative Aussagen über adsorbierte BSA-Mengen sind mit Hilfe der IMC-Thermogramme allein nicht möglich.

Der Entstehung von Assoziationskolloiden geht eine Vielzahl intermolekularer Wechselwirkungen voraus. Dementsprechend ist auch der Zerfall dieser Strukturen von einem Wärmefluss begleitet. Diese Eigenschaft konnte in Demizellarisierungstitrations ausgenutzt werden, um eine CMC-Bestimmung für SDS durchzuführen. Verglichen mit einer tensiometrischen Bestimmung liefert die mikrokolorimetrische Methode sehr exakte Ergebnisse, außerdem ist sie relativ einfach durchführbar. Nachteilig ist, dass für Polysorbat 20 und Quil A aufgrund sehr schwacher Titrationssignale keine CMC-Bestimmung mit dieser Methode möglich ist.

Für inverse Mizellen aus P90G und Isopropylmyristat konnte wie erwartet mit der IMC keine CMC ermittelt werden. Beim Hinzutitrieren kleiner Mengen IPA zu der IML konnte ein exothermes Titrationssignal beobachtet werden, das mit voranschreitender Titration in ein endothermes Signal umschlägt. Unter Berücksichtigung von SAXD-Messungen dieser Systeme konnte der Wärmefluss einer

Strukturänderung der inversen Mizellen durch die Einlagerung von IPA zugeordnet werden. Die IMC ermöglichte eine genaue Bestimmung der IPA-Konzentration, bis zu der eine Integration von IPA in die inversen Mizellen stattfand.

## 7 Literaturverzeichnis

1. **H.-P. Shen, J. Shepherd.** *Thermodynamics: The study of energy.*  
<http://www.sciwrite.caltech.edu/journal03/shiekh.html> : s.n.
2. **W.F. Hemminger, G. Höhne.** *Grundlagen der Kalorimetrie.* : VCH, (1979).
3. **P.W. Atkins.** *Physikalische Chemie 3. korrigierte Auflage.* : Wiley-VCH, (2001).
4. **W.F. Hemminger, H.K. Camenga.** *Methoden der thermischen Analyse.* Berlin : Springer-Verlag, (1989).
5. <http://www.beodom.com/en/journal/entries/principles-of-thermal-insulation-heat-transfer-via-conduction-convection-and-radiation>. [Online]
6. **Y.A. Shreider.** *The Monte Carlo Method.* : Pergamon Press Ltd, (1966). 87.
7. **W. Grimm.** Haltbarkeit und Haltbarkeitsprüfung von Arzneimitteln. (APV-Richtlinie mit Kommentar). *Pharm Ind.* 47, (1985), Bd. (6), S. 627-632.
8. **S. Yoshioka, V.J. Stella.** *Stability of drugs and dosage forms.* New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, (2000).
9. **K.H. Bauer, K.-H. Frömming, C. Führer.** *Pharmazeutische Technologie.* 5. Auflage 1997.
10. **W. Grimm, G. Harnischfeger, M. Tegtmeier.** *Stabilitätsprüfung in der Pharmazie.* Aulendorf : Editio Cantor Verlag, (2004).
11. **S.W. Baertschi.** *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation.* : Taylor & Francis, (2005).
12. **FDA, DRAFT GUIDANCE.** Stability testing. *Guidance for Industry and FDA Current Good Manufacturing Practice for Combination Products.* Sept., (2004).
13. **M. Angberg, C. Nystrom, S. Castensson.** Evaluation of Heat-Conduction Microcalorimetry in Pharmaceutical Stability Studies. II. Methods to Evaluate the Microcalorimetric Response. *Int J Pharm.* 61, (1990), Bd. (1/2), S. 67-77 .
14. **G. Buckton, S.J. Russell, A.E. Beezer.** Pharmaceutical Calorimetry: A Selective Review. *Thermochim Act.* 193, (1992), S. 195-214.
15. **F.E. Runge, R. Hege.** Use of Microcalorimetry in Monitoring Stability Studies. Example: Vitamin A Esters. *J Agric Food Chem.* 48, (2000), Bd. 4755.
16. **M. Angberg, C. Nystrom, S. Castensson.** Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies. VII. Oxidation of ascorbic acid in aqueous solution. *Int J Pharm.* 90, (1993), Bd. (1), S. 19-33 .

17. **M.J. Koenigbauer, S.H. Brooks, G. Rullo, R.A. Couc.** Solid-State Stability Testing of Drugs by Isothermal Calorimetry. *Pharm Res.* 9, (1992), Bd. (7), S. 939-944.
18. **Y. Aso, S. Yoshioka, S. Kojima.** Feasibility of using isothermal microcalorimetry to evaluate the physical stability of amorphous nifedipine and Phenobarbital. *Thermochim Act.* 380, (2001), S. 199-204.
19. **S. Gaisford and G. Buckton.** Potential applications of microcalorimetry for the study of physical processes in pharmaceuticals. *Thermochim Act.* 380, (2001), Bd. (2), S. 185-198.
20. **A.B. Jodar-Reyes, A. Martin-Rodriguez, J.L. Ortega-Vinuesa.** An enthalpic Analysis on the Aggregation of Colloidal Particles Studied by Microcalorimetry. *J Coll Int Sci.* 237, (2001), S. 6-10.
21. **C.V. Skaria, S. Gaisford, M.A.A. O'Neill, G. Buckton, A.E. Beeze.** Stability assessment of pharmaceuticals by isothermal calorimetry: two component systems. *Int J Pharm.* 292, (2005), S. 127–135.
22. **F. Zaman, A.E. Beezer, J.C. Mitchell, Q. Clarkson, J. Elliot, A.F. Davis, R.J. Willson.** The stability of benzoyl peroxide by isothermal microcalorimetry. *Int J Pharm.* 227, (2001), Bde. (1-2), S. 133-137.
23. **L.D. Hansen, E.A. Lewis, D.J. Eatough, R.G. Bergstrom, D. DeGraft-Johnson.** Kinetics of Drug Decomposition by Heat Conduction Calorimetry. *Pharm Res.* 6, (1989), Bd. (1), S. 20-27.
24. **B. Botma, H. Schimansky.** A Comparative Study on Analytical Techniques Used for Compatibility Testing of Explosives. (1988), Bd. 8, S. 24557 .
25. **C.J. Elmqvist, P.E. Lagerkvist, L.G. Svensson.** Stability and Compatibility Testing Using a Microcalorimetric Method. *J Hazar Mat.* 7, (1983), Bd. (3), S. 281-290.
26. **A. Fini, M. Garuti, G. Fazio, J. Alvarez-Fuentes, M.A. Holgado.** Diclofenac Salts. I. Fractal and Thermal Analysis of Sodium and Potassium Diclofenac Salts. *J Pharm Sci.* 90, (2001), Bd. (12), S. 2049-2057.
27. **R. Chadha, N. Kashid, D. V. S. Jain.** Kinetics of degradation of diclofenac sodium in aqueous solution determined by a calorimetric method. *Pharmazie.* 58, (2003), S. 631-635 .
28. **M.E. Palomo, M.P. Ballesteros, P. Frutos.** Analysis of diclofenac sodium and derivatives. *J Pharm Biomed Anal.* 21, (1999), S. 83-94.
29. **R. Cavalli, M.R. Gasco, S. Morel.** Behaviour of timolol incorporated in lipospheres in the presence of a series of phosphate esters. *STP Pharm Sci.* 2, (1992), Bd. (6), S. 514-518.
30. **Gasco, M.R.** Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. 5250236 United States Patent, (1993).

31. **A. Smith, I.M. Hunneyball.** Evaluation of poly(lactid acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *Int J Pharm.* (1986), Bd. 30, S. 215-220.
32. **R.H. Müller, D. Rühl, S.A. Runge, K. Schulze-Forster, W. Mehnert.** Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharm Res.* (1997), Bd. 14, 4, S. 458-462.
33. **R.H. Müller, D. Rühl, S.A. Runge.** Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. *Int J Pharm.* (1996), Bd. 144, S. 115-121.
34. **R.H. Müller, S. Benita, B. Böhm.** *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs.* Stuttgart : Medpharm Scientific, (1998).
35. **A. zur Mühlen.** Feste Lipid-Nanopartikel mit prolongierter Wirkstoffliberation: Herstellung, Langzeitstabilität, Charakterisierung, Freisetzungsverhalten und –mechanismen. *Dissertation Freie Universität Berlin.* (1996), Bd. .
36. **C. Schwarz, W. Mehnert.** Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* (1997), Bd. 157, S. 171-179.
37. **R.H. Müller, C. Schwarz, A. zur Mühlen, W. Mehnert.** Incorporation of lipophilic drugs and drug release profiles of solid lipid nanoparticles (SLN). *Proc. Int. Control. Release.* 20, (1994), S. 480-481.
38. **R.H. Müller, A. Dingler.** Feste Lipid-Nanopartikel als neuartige Carrier für Wirkstoffe. *PZ.* (1998), Bd. Nr. 49, Jahrg. 143.
39. **C. Schwarz et al.** Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterisation and sterilisation. *J Contr Rel.* (1994), Bd. 30, S. 83-96.
40. **I. Friedrich.** Entwicklung und Charakterisierung von Nanosuspensionen auf Basis erstarrter invers mizellarer Lösungen (SRMS) als ophthalmologisches Drug Delivery System. *Dissertation TU-Braunschweig.* (2004).
41. *Workshop Particulate Drug Delivery Systems.* **G.G. Liversidge.** Kyoto : 23rd Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater, (1996).
42. **R.H. Müller, S.A. Runge.** Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery, Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery. [Buchverf.] B.H.L. Böhm S. Benita. *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs.* Stuttgart : medpharm Scientific Publishers , (1998), S. 219-234.
43. **M.A. Schubert, C.C. Müller-Goyman.** Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* (2003), Bd. 55, S. 125-131.
44. **K. Thoma, P. Serno, D. Precht.** Röntgendiffraktometrischer Nachweis der Polymorphie von Hartfett. *Pharm Ind.* (1983), Bd. 45, (4), S. 420-425.
45. **K. Larsson.** Classification of glyceride crystal forms. *Acta Chem Scand.* (1966), Bd. 20, S. 2255-2260.



46. **L. Hernqvist, K. Anjou.** Diglycerides as a Stabilizer of the Beta-Crystal Form in Margarines and Fats. *Fette Seifen Anstrichm.* (1983), Bd. 85, S. 64-66.
47. **N. Garti, J. Schlichter, I. Mayer, S. Sarig.** Solid emulsifiers and polymorphic transitions. *Tens Deterg.* 24, (1987), Bd. (1), S. 42-45.
48. **H. Bunjes, K. Westesen, M.H.J. Koch.** Crystallisation tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *Int J Pharm.* (1996), Bd. 129, S. 159-173.
49. *Proceedings 2nd World Meeting APGI/APV.* **M.J. Grau, R.H. Müller.** Paris, (1998). Increase of dissolution velocity and solubility of poorly soluble drugs by formulation as nanosuspension. S. 623–624.
50. **A. Mersmann, M. Kind, J. Stichlmair.** *Thermische Verfahrenstechnik Grundlagen und Methoden.* Berlin, Heidelberg : Springer, (2005).
51. **M.Castro, F. Domínguez-Adame, A. Sánchez, T. Rodríguez.** Model for crystallization kinetics: Deviations from Kolmogorov-Johnson-Mehl-Avrami kinetics. *Appl. Phys. Lett.* (1999), Bd. 75, (15), S. 2205-2207.
52. **M. Avrami.** Kinetics of phase change. I General theory. *J Chem Phys.* (1939), Bd. 7, S. 1103-1112.
53. **S. Latsch.** *Einsatz der isothermen Wärmeleitungsmikrokalorimetrie zur Stabilitätsbeurteilung von Transdermalen Therapeutischen Systemen (TTS).* Frankfurt am Main : Dissertation, 2003.
54. **M. Ueda, A. Iwara, J. Kreuter.** Influence of the preparation methods on the drug release behaviour of loperamide-loaded nanoparticles. *J Microencapsul.* (1998), Bd. 15, 3, S. 361-72.
55. **R.H. Müller, C. Jacobs, O. Kayse.** Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy Rationale for development and what we can expect for the futur. *Adv Drug Deliv Rev.* (2001), Bd. 47, S. 3-19.
56. **A. Gessner, C. Olbrich, W. Schröder, O. Kayser, R.H. Müller.** The role of plasma proteins in brain targeting: species dependent protein adsorption patterns on brain-specific lipid drug conjugate (LDC) nanoparticles. *Int J Pharm.* (2001), Bd. 214, S. 87-91.
57. **M. Lück, B.-R. Paulke, W. Schröder, T. Blunk, R.H. Müller.** Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. *J Biomed Mater Res.* (1997), Bd. 1, S. 478-485.
58. **T.M.Goppert, R.H. Müller.** Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns. *J Drug Target.* (2005), Bd. 13, (3), S. 179-187.
59. **A. zur Mühlen, C. Schwarz, W. Mehnert.** Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm.* (1998), Bd. 45, (2), S. 149-155.

60. **A. zur Mühlen, W. Mehnert.** Drug release and release mechanism of prednisolone loaded Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmazie*. 53, (1998), Bd. 8.
61. **Y. Maa, C. Hsu.** Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface. *Biotechnol. Bioeng.* (1997), Bd. 54, S. 503-512.
62. **A. Oliva, A. Santoven, J. Farin.** Effect of high shear rate on stability of proteins: kinetic study. *J Pharm Biomed Anal.* (2003), Bd. 33, S. 145-155.
63. **H.K. Can, A. Güner.** Investigation of adsorption-desorption dynamism of bovine serum albumin on crosslinked N,N-diethylaminoethyl dextran microbeads: Solution phase. *J Appl Polym Sci.* (2006), Bd. 99, (5), S. 2288-2299.
64. **F. E. Filisko, D. Malladi, S. Barenberg.** Character of adsorbed bovine serum albumin from adsorption enthalpies. *Biomaterials.* (1986), Bd. 7, S. 348-353.
65. **P. Mukerjee.** Micellar properties of drugs: micellar and nonmicellar patterns of self-association of hydrophobic solutes of different molecular structures - monomer fraction, availability, and misuses of micellar hypothesis. *J Pharm Sci.* (1974), Bd. 63, S. 972-981.
66. **A. Ben-Shaul, I. Szleifer, W.M. Gelbart.** Statistical thermodynamics of amphiphile chains in micelles. *Proc Natl Acad Sci.* (1984), Bd. 81, (14), S. 4601-4605.
67. **M.A. Hammad, B.W. Müller.** Solubility and stability of tetrazepam in mixed micelles. *Eur J Pharm Sci.* (1998), Bd. 7, (1), S. 49-55.
68. **A. Helenius, K. Simons.** Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys Acta.* (1975), Bd. 415, S. 29-79.
69. **J.M. Hierrezuelo, J. Aguiar, C.C. Ruiz.** Stability, interaction, size, and microenvironmental properties of mixed micelles of decanoyl-N-methylglucamide and sodium dodecyl sulfate. *Langmuir.* (2004), Bd. 20, (24), S. 10419-26.
70. **C. Carnero Ruiz, J. Aguiar.** Interaction, Stability, and Microenvironmental Properties of Mixed Micelles of Triton X100 and n-Alkyltrimethylammonium Bromides: Influence of Alkyl Chain Length. *Langmuir.* (2000), Bd. 16, S. 7946-7953.
71. **J.A. Nicolazzo, B.L. Reed, B.C. Finnin.** Assessment of the effects of sodium dodecyl sulfate on the buccal permeability of caffeine and estradiol. *J Pharm Sci.* (2004), Bd. 93, (2), S. 431-440.
72. **B. Saletu, P. Anderer, K. Kinsperger, J. Grunberger, W. Sieghart.** Comparative bioavailability studies with a new mixed-micelles solution of diazepam utilizing radioreceptor assay, psychometry and EEG brain mapping. *Int Clin Psychopharmacol.* (1988), Bd. 3, (4), S. 287-323.
73. **H.F. Eicke, H. Christen.** Nucleation Process of Micelle Formation in apolar Solvents. *J Colloid Interf Sci.* (1974), Bd. 48, (2), S. 281-290.

74. **N. Müller.** A Multiple-Equilibrium Model for the Micellization of Ionic Surfactants in Nonaqueous Solvents. *J Phys Chem.* (1975), Bd. 79, 3, S. 287-291.
75. **B. Lindman.** Micelles, Vesicles and Microemulsions. [Buchverf.] V. deGiorgio and M. Cortesi. *Physics of Amphiphiles.* Amsterdam : North Holland Physics Publishing, 1985, S. 7-23.
76. **R. Hague, I.J. Tinsley, D. Schmedding.** Nuclear magnetic resonance studies of phospholipid micelles. *J Biol Chem.* 10, 1972, Bd. 247, (1), S. 157-61.
77. **H. Willmann, P. Walde, P.L. Luisi, A. Gazzaniga, F. Stroppolo.** Lecithin Organogel as Matrix for Transdermal Transport of Drugs. *J Pharm Sci.* (1992), Bd. 81, (9), S. 871-875.
78. **C.C. Müller-Goymann, H.-J. Hamann.** Sustained release from reverse micellar solutions by phase transformations into lamellar liquid crystals. *J Control Release.* (1993), Bd. 23, S. 165-174.
79. **S. Tegtmeier, I. Papantoniou, C.C. Müller-Goymann.** Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochlorid. *Eur J Pharm Biopharm.* (2001), Bd. 51, S. 119-125.
80. **J.-H. Fuhrhop, J. Mathieu.** Wege zu funktionalen Vesikeln ohne Proteine. *Angew Chem.* (1984), Bd. 96, S. 124-137.
81. **J.-H. Fuhrhop, D. Fritsch.** Bolaamphiphiles Form Ultrathin Porous and Unsymmetric Monolayer Membranes. *Accts Chem Res.* (1986), Bd. 19, S. 130-137.
82. **D. Oakenfull, G.S. Sidhu.** Saponins. [Buchverf.] P.R. Cheeke. *Toxicants of Plant Origin. Volume II. Glycosides.* Boca Raton, FL : CRC Press Inc., (1989), S. 97-141.
83. **B. Morein, B. Sundquist, S. Höglund, K. Dalsgaard, A. Osterhaus.** Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature.* (1984), Bd. 308, S. 457-460.
84. **E. Sundfeld, S. Yun, J.M. Krochta, T. Richardson.** Separation of cholesterol from butteroil using Quillaja saponins. I. Effects of pH, contact time, and adsorbent. *J Food Process Eng.* (1993), Bd. 16, S. 191-205.
85. **E. Sundfeld, J.M. Krochta, T. Richardson.** Separation of cholesterol from butteroil using Quillaja saponins. II. Effects of temperature, agitation and concentration of Quillaja solution. *J Food Process Eng.* (1993), Bd. 16, S. 207-226.
86. **G.F.A. Kersten, A. Spiekstra, E.C. Beuvery, D.J.A. Crommelin.** On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (iscoms). *Biochim Biophys Acta.* (1991), Bd. 1062, S. 165-171.
87. **G.F.A. Kersten, D.J.A. Crommelin.** Liposomes and ISCOMs as vaccine formulations. *Biochim Biophys Acta.* (1995), Bd. 124, S. 117-138.

88. **I. Claassen, A. Osterhaus.** The iscom structure as an immune enhancing moiety: experience with viral systems. *Res Immunol.* (1992), Bd. 143, (5), S. 531-541.
89. **G.F.A. Kersten, D.J.A. Crommelin.** Liposomes and ISCOMs. *Vaccine.* (2002), Bd. 21, S. 915-920.
90. **B. Morein, K.F. Hu, I. Abusuugra.** Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* (2004), Bd. 56, (10), S. 1367-1382.
91. **G. Rimmelzwaan, A. Osterhaus.** ISCOMs: Materials, preparation, antigen delivery and immune response. [Buchverf.] H.P. Merkle, G. Corradin B. Gander. *Antigen Delivery Systems: Immunological and Technological Issues.* Amsterdam : Harwood Academic Publishers, (1997), S. 123-138.
92. **R.G. Strickley.** Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res.* (2004), Bd. 21, (2), S. 201-30.
93. **N. Scholer, C. Olbrich, K. Tabatt, R.H. Müller, H. Hahn, O. Liesenfeld.** Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. *Int J Pharm.* 19, (2001), Bd. 221, (1-2), S. 57-67.
94. **ThermoMetric.** Abbildung aus Produktinformationen zum Thermal Activity Monitor (TAM). Schweden, 1993.
95. **J. Suurkuusk, I. Wadsö.** A multichannel microcalorimetry system. *Chem Scripta.* (1982), Bd. 20, S. 155–163.
96. **Handout von Thermometric.** *TAM Thermal Activity Monitor for highly sensitive isothermal analyses.* Schweden : Thermometric.
97. **M. K. Parmara, A. E. Beezerb and R. J. Willson.** An isothermal microcalorimetric study of the imidazole catalysed hydrolysis of triacetin and the observed rate constant dependence of triacetin concentration. *Thermochim Act.* (2004), Bd. 424, (1-2), S. 219-222.
98. **M.A. Schubert, B.C. Schicke, C.C. Mueller-Goymann.** Thermal analysis of the crystallization and melting behavoir of lipid matrices and lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *Int. J. Pharm.* 298, 2005, S. 242-254.
99. **L. Baydoun.** *Amphiphilic Starch - a New Excipient for Ophthalmic Application.* Dissertation TU-Braunschweig 2008.
100. **T. Hladoń and B. Ćwiertnia.** The effect of humidity on the stability of diclofenac sodium in inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin in the solid state. *Pharmazie.* (1999), Bd. 54, (12), S. 943-944.
101. **M. Bartolomei, P. Bertocchi, E. Antoniella, A. Rodomonte.** Physico-chemical characterisation and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. *J Pharm Biomed Anal.* 18, (2006), Bd. 40, (5), S. 1105-1113.

102. **A. Fini, G. Fazio, J. Alvarez-Fuentes, M.J. Fernandez-Hervas, M.A. Holgado.** Dehydration and rehydration of a hydrate diclofenac salt at room temperature. *Int J Pharm.* (1999), Bd. 181, S. 11–21.
103. **M.E. Palomo, M.P. Ballesteros, P. Frutos.** Analysis of diclofenac sodium and derivatives. *J Pharm Biomed Anal.* (1999), Bd. 21, S. 83-94.
104. **C.M. Adeyeye, P.-K. Li.** Diclofenac Sodium. [Buchverf.] Florey. *Analytical Profiles of Drug Substance.* San Diego : Academic Press Inc, (1990), Bd. 19, 7, S. 125-13.
105. **Y.A Ribeiro, J.D.S. De Oliveira, M.I.G. Leles, S.A. Juiz, M. Ionashiro.** Thermal decomposition of some analgesic agents. *J Therm Anal.* (1996), Bd. 46, S. 645-1655.
106. **P. Tudja, M.Z.I. Khan, E. Mestrovic, M. Horvat, P. Golja.** Thermal Behaviour of Diclofenac Sodium: Decomposition and Melting Characteristics. *Chem Pharm Bull.* (2001), Bd. 49, (10), S. 1245-1250.
107. **A. Fini, M. Garuti, G. Fazio, J. Alvarez-Fuentes, M.A. Holgado.** Diclofenac Salts. I. Fractal and Thermal Analysis of Sodium and Potassium Diclofenac Salts. *J Pharm Sci.* (2001), Bd. 90, (12), S. 2049-2057.
108. Wikipedia "Verdampfungswärme". [Online]  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Verdampfungsw%C3%A4rme>.
109. **M. Pudipeddi, T.D. Sokoloski, S.P. Duddu, J.T. Carstensen.** Quantitative characterization of adsorption isotherms using isothermal microcalorimetry. *J Pharm Sci.* (1996), Bd. 85, (4), S. 381-386.
110. **M.A. Schubert.** Development and characterisation of surface-modified lipid nanoparticles for protein delivery. *Dissertation TU-Braunschweig.* 2005.
111. **W. Mehnert, K. Mäder.** Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv.* 47, (2001), (2-3), S. 165-96.
112. **J.W. Hagemann.** Thermal behaviour and polymorphism of acylglycerides. [Buchverf.] N. Garti and K. Sato. *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids.* New York, USA : Marcel Dekker, (1988), S. 29-67.
113. **B. Siekmann, K. Westesen.** Thermoanalysis of the recrystallisation process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. *Coll Surf B.* (1994), Bd. 3, S. 159-175.
114. **K. Westesen, H. Bunjes.** Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? *Int J Pharm.* (1995), Bd. 115, S. 129-131.
115. **M.A. Schubert, C.C. Müller-Goymann.** Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and non-ionic emulsifier. *Eur J Pharm Biopharm.* (2005), Bd. 61, S. 77-86.

116. **I. Asencio, F. Dorado, P. Sánchez, J. Lobato.** Calculation of kinetic parameters for crystallization processes. abstract volume 7, (2002), Bde. 19-22, DOI 10.1333/s00897010527a.
117. **B. Vanhoutte, I. Foubert, F. Duplacie, A. Huyghebaert, K. Dewettinck.** Effect of phospholipids on isothermal crystallization and fractionation of milk fat. *Eur J Lipid Sci Technol.* (2002), Bd. 104, S. 738-744.
118. **R. Hussein.** Charakterisierung von Hartfettmatrices und Lipidnanosuspensionen mit Phospholipon 90 H. Dissertation TU-Braunschweig 2009.
119. **M.A. Schubert, M. Harms, C.C. Mueller-Goymann.** Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2006), Bd. 27, S. 226-236.
120. **F. E. Filisko, D. Malladi, S. Barenberg.** Character of adsorbed bovine serum albumin from adsorption enthalpies. *Biomaterials.* (1986), Bd. 7, S. 348-353.
121. **F. Hussein.** *Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Proteinadsorption an Primärpackmitteln, Dissertation .* TU-Braunschweig : s.n., (2007).
122. **S. N. Levine.** Thermodynamics of adsorbed protein films. *J Biomed Mater Res.* (1969), Bd. 3, 83.
123. **W. Norde, J. Lyklema.** Thermodynamics of Protein adsorption. *J Coll Interf Sci.* (1979), Bd. 71, 350.
124. **C. Tanford.** Protein denaturation. Part B: the transition from native to denaturated state. *Adv Prot Chem.* (1968), Bd. 23, 121.
125. **S.H. Brewer, W.R. Glomm, M.C. Johnson, M.K. Knag, S. Franzen.** Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. *Langmuir.* (2005), Bd. 21, S. 9303-9307.
126. **J.Gualbert, P. Shahgaldian, A.W. Coleman.** Interactions of amphiphilic calix[4]arene-based Solid Lipid Nanoparticles with bovine serum albumin. (2003), Bd. 257, S. 69–73.
127. **A. Nadarajah, C. F. Lu, K. K. Chittur.** Modeling the Dynamics of Protein Adsorption to Surfaces. [Buchverf.] J.L. Brash T.A. Horbett. *Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications.* ACS Symposium Series Vol. 602 : s.n., (1995).
128. **C.F. Lu, A. Nadarajah, K.K. Chittur.** A comprehensive model of multiprotein adsorption on surfaces. *J Coll Interf Sci.* (1994), Bd. 168, S. 152-161.
129. **Wikipedia - Sorptionsisotherme.**  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Sorptionsisotherme#Langmuir-Isotherme>.
130. **M. Müller, S. Mackeben, C.C. Müller-Goymann.** Physicochemical characterisation of liposomes with encapsulated local anaesthetics. *Int. J. Pharm.* 274, (2004), S. 139-148.

131. **J. Pereira-Lachataigneraisa, R. Ponsa, P. Panizzab, L. Courbinb, J. Rouchb, O. López.** Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method. *Chem Phys Lip.* (2006), Bd. 140, (1-2), S. 88-97.
132. **P. Garidel, A. Hildebrand, R. Neubert, A. Blume.** Thermodynamic characterization of bile salt aggregation as a function of temperature and ionic strength using isothermal titration calorimetry. *Langmuir.* (2000), Bd. 16, S. 5267-5275.
133. **A. Hildebrand, P. Garidel, R. Neubert, A. Blume.** Thermodynamics of demicellisation of mixed micelles composed of sodium oleate and bile salts. *Langmuir.* (2004), Bd. 10, S. 320-328.
134. **P. Garidel, A. Hildebrand, A. Blume.** *MicroCal Application Note: Understanding the Self-Organisation of Association Colloids.* Halle, Saale : s.n.
135. **N. Aust, P. Zugenmaier.** Formation of supermolecular structures of polysaccharidesurfactant complexes in aqueous solutions. Influence of the polymer backbone. *Makromol Chem.* (1993), Bd. 194, S. 1583 -1593.
136. **S. Mitra, S. Dungan.** Micellar Properties of Quillaja Saponin. 1. Effects of Temperature, Salt and pH on Solution Properties. *J Agric Food Chem.* (1997)., Bd. 45, S. 1587-1595.
137. **T. Paepenmüller.** Mündliche Auskunft. (2007).
138. **M. Harms.** *Röntgenuntersuchungen an kolloidalen Arzneiformen am Beispiel von: Oberflächenmodifizierten Lipidnanopartikeln und Quil A-Assoziaten, Dissertation.* TU-Braunschweig : s.n., 2008. <http://www.digibib.tu-bs.de/?docid=00022064>.
139. **D. Oakenful.** Aggregation of saponins and bile acids in aqueous solution. *Aust J Chem.* (1986), Bd. 39, (10), S. 1671-1683.
140. **D.M. Small, S.A. Penkett, D. Chapman.** Studies on simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochim Biophys Act.* (1969), Bd. 176, S. 178–189.
141. **N.A. Mazer, M.C. Carey, R.F. Kwasnick, G.B. Benedek.** Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Size, shape and thermodynamics of bile salt micelles. *Biochemistry.* (1979), Bd. 18, S. 3064–3075.
142. *Small-angle neutron scattering (SANS) of Quil A micelles.* **M. Harms, T. Paepenmüller, V.M. Garamus, C.C. Müller-Goymann.** 3. Zsigmondy Kolloquium Berlin : s.n., (2006).
143. **C. Hemelrijck.** *Einfluss von Isopropanol und Scherung auf eine invers mizellare Lösung aus Lecithin und Isopropylmyristat, Diplomarbeit.* MLU-Halle (2006).